УДК 615.371:57.083.2

ПОРІВНЯННЯ ІМУНОГЕННОСТІ І БІЛКОВОГО СКЛАДУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТА ОФІЦІНАЛЬНОЇ ВІРОСОМАЛЬНИХ ПРОТИГРИПОЗНИХ ВАКЦИН

Волянський А.Ю., Погоріла М.С., Романова О.А., Давидова Т.В., Мартинов А.В., Ігумнова Н.І., Сидоренко Т.А., Юхименко В.І., Перемот С.Д., Смілянська М.В., Кашпур Н.В.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України»

Пандемічний характер поширення, часто складний перебіг та висока частота ускладнень з року в рік виводять грип до центру уваги як практичних лікарів, так і науковців медичної та фармацевтичної галузей охорони здоров'я. У рамках пошуку нових шляхів створення, дослідження функціональних особливостей та закономірностей імунологічного впливу протигрипозних вакцин було досліджено імуногенність новоствореної ліпосомальної вакцини «Ліпос №2» у порівнянні з тривалентною офіцінальною віросомальною вакциною «Інфлексал». Досліджено білковий склад офіцінальних вакцин «Інфлювак» та «Інфлексал» із застосуванням біоаналізатора «Agilent 2100». Виявлено значну імуногенність експериментальної вакцини, котра викликала стійке підвищення рівня специфічних антитіл до усіх трьох вірусних антигенів у більшості дослідних тварин у порівнянні з вакциною, що перебувала у контролі.

Ключові слова: тривалентні віросомальні протигрипозні вакцини, білковий склад, імуногенність.

Грип – гостра вірусна інфекційна хвороба, що характеризується ураженням верхніх дихальних шляхів та має періодичне епідемічне та пандемічне поширення. Проникаючи повітряно-краплинним шляхом від людей та деяких тварин із типовим, інапарентним та стертим перебігом, вірус грипу частіше викликає раптове підвищення температури тіла, прояви інтоксикації, катаральні та респіраторні симптоми, тяжкість котрих варіює в залежності від клінічної форми грипу.

Серед багатьох підтипів вірусів грипу А нині циркулюють підтипи грипу А(H1N1) та А(H3N2), зустрічається також і вірус В, що і обумовлює склад новітніх сезонних протигрипозних вакцин [1]. Так епідемії, що викликаються вірусом грипу А, виникають приблизно з періодичністю 3 роки, спричинені вірусом грипу В – приблизно кожні 5 років.

Після контакту організму з вірусом формується набутий високоспецифічний імунітет до даного серотипу вірусу, що здатний попередити розвиток захворювання при повторному контакті із ним. Однак завдяки високій реасортації та мутагенності, якими вирізняється вірус грипу А, виникають віруси даного типу з новими антигенними властивостями, для боротьбі з котрими система імунітету не має імунологічної пам'яті, оскільки тривалість набутого імунітету до конкретного антигенного варіанту складає близько 20 років.

Отже, не має сумніву у актуальності пошуку нових шляхів створення і дослідження закономірностей імунологічного впливу протигрипозних вакцин, у тому числі шляхом удосконалених варіантів останніх.

За останні 15 років удосконалено технології створення ліпосомальних вакцин і на сьогоднішній день декілька вакцин, що містять ліпосоми з ад'ювантами, були схвалені для використання або досягли останньої стадії клінічної оцінки.

Ліпосоми (везикули з фосфоліпідного бішару) є універсальними і надійними системами доставки антигенів для індукції антитіл і активації Т-лімфоцитів. В 1974 р. Грегоріадис та Елісон вперше повідомили про використання ліпосом в якості імунологічних ад'ювантів. Нині принаймні 8 ад'ювантів на основі ліпосом схвалені для використання у клініці або проходять клінічні випробування. Зокрема, віросоми, що складаються з компонентів мембран вірусу грипу (ліпідів та глікопротеїнів) з додаванням фосфатидилхоліну, використовуються як компоненти ліцензованих грипозної та гепатитної вакцин з 1997 року [2-5]. Наприклад, «Інфлексал», віросомальна вакцина проти грипу, набула популярності у 43 країнах світу і реалізується у кількості більше, ніж 60 мільйонів доз [6-9]. Дослідження і розробка ліпосомальних вакцин значно активізувалися в останні 10 років, з 1316 результатів досліджень, що були опубліковані щодо ліпосомальних вакцин у 1974 - 2010 роках, половина припадає на останні 8 років і одна чверть препаратів була запатентована за останні 3 роки.

Успіх ліпосомальних вакцин і зростаючий інтерес до їх удосконалення можна віднести до ряду ключових переваг у порівнянні з іншими системами доставки антигенів і посилення імунної відповіді. Найголовнішою перевагою ліпосом є їх безпечність і добра переносність, як показало використання затверджених на основі ліпосом протиракових та антиінфекційних препаратів, таких як «Доксіл» (Джонсон і Джонсон) і «Володі» (Гілеад Сайнсес) [10-12]. Крім того, численні застосування ліпосомальних вакцин-кандидатів продемонстрували прийнятно низьку реактогенність [2-9, 13, 14]. Оскільки ліпосоми найчастіше складаються з ліпідів, які зустрічаються в клітинних мембранах, таких як фосфотидилхолін та холестерол, вони легко метаболізуються в організмі. Іншою ключовою перевагою систем доставки вакцинних антигенів на основі ліпосом є їх універсальність. Однією з найважливіших характеристик вакцинних препаратів є імуногенний ефект.

Метою проведеного дослідження було вивчення імуногенності експериментального зразку новоствореної ліпосомальної грипозної вакцини «Ліпос №2» та зіставлення її з аналогічною характеристикою офіцінальної віросомальної вакцини «Інфлексал», дозволеної до застосування в Україні.

Дослідження проведено у рамках НДР «Розробка нових підходів щодо створення вірусних вакцин, вивчення залежності їх специфічної активності від типу та ступеню модифікації компонентів», № держреєстрації 0113U001518.

Матеріали та методи

В експерименті були використані білі безпородні миші вагою 20-21 г, віком 2 місяці, що перебували у

віварії ДУ «ІМІ НАМНУ» за стандартних умов утримання та режиму харчування. Робота з тваринами проводилась згідно з принципами Гельсінської декларації, прийнятою Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (1964 – 2000 рр.), згідно з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для досліджень та інших наукових цілей" [15].

Об'єктами дослідження у якості контролю та складових новоствореної грипозної ліпосомальної вакцини були тривалентні офіцінальні сезонні вакцини для профілактики грипу: «Інфлювак» (Солвей Фарма, Нідерланди), «Інфлексал» (Берна Біотех ЛТД, Швейцарія). Дослідним зразком слугувала новостворена експериментальна ліпосомальна грипозна вакцина під умовним номером №2 («Ліпос №2») – ліпосомальна грипозна вакцина з ліпосом з негативним зарядом, до складу якої увійшов антигенний склад вакцини «Інфлювак».

Препарат «Інфлювак» сезону 2013-2014 рр. являв собою тривалентну субодиничну вакцину, що містить лише поверхневі антигени гемаглютинін (ГА) та нейрамінідазу (НА) вірусів грипу типу А і В і характеризується виробниками як високоочищена від інших компонентів вакцинного штаму.

Вакцина «Інфлексал» являє собою систему, що містить лецитинові віросоми високоочищенних поверхневих антигенів вірусів грипу А і В. Віросоми, відомі також як IRIV (Immunopotentiating Reconstituted Influenza Virosomes), є двошаровими сферичними везикулами, які містять очищені антигени ГА та НА. Це забезпечує більш природну презентацію антигенів порівняно з альтернативними ад'ювантами.

З метою конструювання експериментального зразку ліпосомальної грипозної вакцини №2 ліпосоми одержували методом випарювання ліпідів на вакуумному ротаційному випарювачі (Vakuum-Rotation, Німеччина) з наступним суспендуванням у розчинах вакцин Інфлювак і озвучуванням на диспергаторі УЗДН-А (РФ) протягом 1-3 хв. Співвідношення антиген-ліпіди було 1:200 відповідно. Озвучування ліпосом здійснювали при охолодженні до Т=(2-4)˚С.

При виготовленні експериментального зразку №2 була використана суміш ліпідів з негативним зарядом. Негативно заряджені ліпосоми отримували додаванням до лецитину (10 % спиртовий розчин) кислого ліпіду кардіоліпіну у співвідношенні кардіоліпін/лецитин 1:9, відповідно. Співвідношення антигени/ліпіди було 1:10, відповідно. Розмір ліпосом цього складу становив (160-170) нм при озвучуванні протягом 3 хв.

Піддослідних тварин дворазово імунізували препаратами та на 14 добу після останньої імунізації здійснили забір крові задля дослідження імуногенності вакцин. Таким чином було сформовано наступні групи: I група – тварини, перша імунізація яких здійснювалася вакциною «Інфлексал» внутрішньочеревно (в/ч) в дозі 0,25 мл, друга в такій же дозі - через 14 діб (n=11); II група - тварини, перша імунізація котрих здійснювалася вакциною «Ліпос №2» внутрішньочеревно в дозі 0,25 мл, друга в такій же дозі - через 14 діб (n=11); III група – контрольна група, тваринам, якої здійснювали в/ч введення стерильної води для ін'єкцій у дозі 0,25 мл дворазово з інтервалом в 14 діб (n=11). Тварини були виведені з експерименту на 14 добу після другої імунізації шляхом декапітації під ефірним наркозом.

При проведенні статистичного аналізу отриманих в експерименті даних застосовували критерій Ст'юдента за допомогою комп'ютерних програм Origin та Microsoft Office Excel 2003 [16]. Дослідження було одноцентровим.

Імуногенність вакцин досліджували за реакцією гальмування гемаглютинації (РГГА) зі специфічним антигеном (вірусом грипу типу А та типу В) [17].

Склад білків, що містять досліджувані вакцини «Інфлексал» та «Інфлювак», вивчали за допомогою біоаналізатора «Agilent-2100» («Agilent Technologies», США), застосовуючи метод SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Цей високодозвільний метод розділення та ідентифікації білкових сумішей являє собою електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності потужного детергенту – додецилсульфату натрія у модифікації Леммлі [18, 19].

Аналіз на «Agilent-2100» проводили, використовуючи чіпи для аналізу одночасно 12 зразків досліджуваних вакцин. Білковий склад вакцин визначали за електрофореграмами, отримуючи дані про молекулярну масу білкових фрагментів, їх концентрацію та відсотковий вміст у досліджуваному препараті. Також визначали середню кількість протеїнів на вакцинний штам.

За дослідження білкового складу офіцінальної віросомальної вакцини «Інфлексал» використовували метод попередньої дезінтеграції ліпосом [20]. Для визначення концентрації та білкового складу суміші поверхневих антигенів вірусів грипу вакцинного препарату, що потрапив до ліпосом, ліпосомальні везикули у присутності 2М буферного розчину хлориду натрію у співвідношенні об'ємів 1:1 руйнували (дезінтегрували) додаванням до суспензії 3-кратного об'єму хлороформу з наступним нагріванням до Т=(50-60)˚С і центрифугуванням при 500g протягом 5 хв. Концентрацію та білковий склад препарату, що вийшов у водну фазу, визначали, як і у інших досліджених вакцин, методом SDS-PAGE на біоаналізаторі «Agilent-2100».

Результати та їх обговорення

Внаслідок одноразової імунізації вакциною «Інфлексал» було зареєстровано збільшення гомологічних антитіл до вірусу А (H1N1) у сироватці крові 56 % мишей у 16 разів, (t=3,1). У 4 рази відбулося підвищення специфічних антитіл до вірусу А (H3N2) та вірусу В у 67 % мишей, (t=3,02).

У разі імунізації «Ліпос №2» максимальні титри специфічних антитіл до H1N1, H3N2 та вірусу В були однаковими та в 4 рази перевищували контрольні значення у 78 % мишей по всіх антигенах при одноразовій імунізації (табл. 1).

Таблиця 1 – Максимальні титри специфічних антитіл до вірусу А (H1N1), (H3N2) та вірусу В на 14 добу після одноразової імунізації протигрипозними вакцинами «Інфлексал» та «Ліпос №2»

Вакцинні препарати, (n=11)	Вірус А (H1N1)		Вірус А (H3N2)		Вірус В	
	Титр антитіл	Частота даного титру в групі, %	Титр антитіл	Частота даного титру в групі, %	Титр антитіл	Частота даного титру в групі, %
«Інфлексал»	1:160	56	1:40	67	1:40	67
«Ліпос №2»	1:40	78	1:40	78	1:40	78
Контроль	1:10	50	1:10	55	1:10	55

Після дворазової імунізації вакциною «Інфлексал» відбувся приріст специфічних антитіл до вірусу А (H1N1) у сироватці крові 56 % мишей (t=3,2) у 32 рази. У 16 разів відбулося підвищення специфічних антитіл до вірусу А (H3N2) у 67 % мишей (t=2,81) та вірусу В - у 56 %, (t=2,94). тварин. При застосуванні препарату «Ліпос №2» за дворазовою схемою також було відмічено 16 кратне зростання специфічних антитіл до усіх трьох антигенів, при цьому простежувалася та ж картина, що і за умови одноразової імунізації, а саме приріст антитіл до вірусних антигенів у значно більшого числа тварин, котрі перебували у досліді, а саме у 89 % мишей (табл. 2).

Таблиця 2 – Максимальні титри специфічних антитіл до вірусу А (H1N1), (H3N2), та вірусу В при дворазовій імунізації протигрипозними вакцинами «Інфлексал» та «Ліпос №2»

Вакцинні препарати, (n=11)	Вірус А (H1N1)		Вірус А (H3N2)		Вірус В	
	Титр антитіл	Частота даного титру в групі, %	Титр антитіл	Частота даного титру в групі, %	Титр антитіл	Частота даного титру в групі, %
«Інфлексал»	1:320	56	1:160	67	1:160	56
«Ліпос №2»	1:160	89	1:160	89	1:160	89
Контроль	1:10	55	1:10	67	1:10	56

Таким чином, при дослідженні імуногенності обраних протигрипозних вакцин за умови одноразової та дворазової імунізацій було відмічено, що при застосуванні «Інфлексалу» та експериментальної вакцини «Ліпос №2» рівень гомологічних антитіл до антигенів вірусів грипу А та В у сироватці крові був однаковим, проте реєструвався у більшого відсотку дослідних тварин, а саме у 78 % (t=3,2) проімунізованих тварин за одноразового введення та у 89 % (t=3,17) - за умови дворазової імунізації при застосуванні препарату «Ліпос №2».

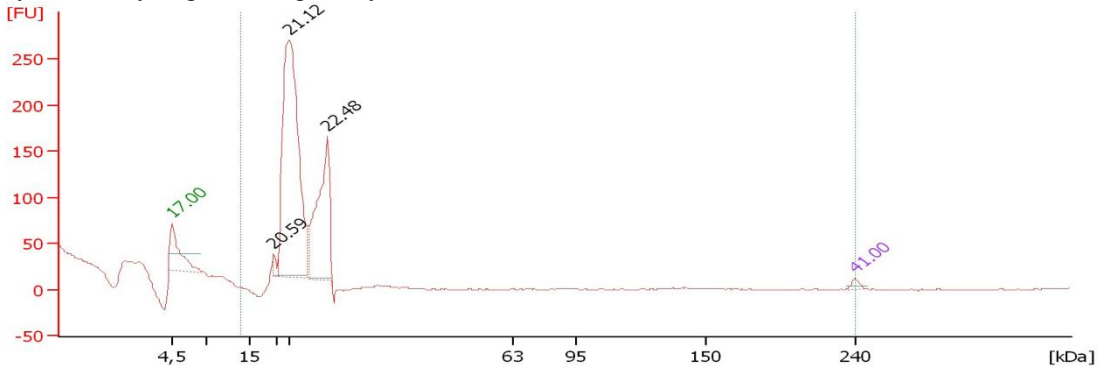

Рисунок 1 – Електрофореграма білкового складу вакцини «Інфлювак», отримана на біоаналізаторі «Agilent 2100»

Відомо, що вимоги Європейської Фармакопеї щодо складу вакцин неоднакові як до субодиничних, так і розщеплених вакцин [21]. Загальний вміст білку у розщеплених вакцинах не повинен перевищувати 100 мкг на один використаний штам і, відповідно, на одну дозу щодо моновалентних вакцин; що стосується субодиничних вакцин, цей показник становить 80 мкг. У складі субодиничних вакцин дозволяється не більше 40 мкг іншого білку на один вірусний штам, ніж ГА.

Субодинична тривалентна вакцина «Інфлювак», що вміщує поверхневі антигени вірусів типів А і В, містить на штам загального білку 83,41 мкг/мл (рис. 1.). Слід підкреслити, що основними компонентами препарату є два білки: 70,1 % загального білкового вмісту складає компонент 46,0 кДа у концентрації 58,49 мкг/мл; другою складовою є білок 49,0 кДа у кількості 23,61 мкг/мл, що становить 28,3 % від загального вмісту білку. Окрім цього, визначено, що до складу вакцинного препарату входить також незначна кількість (1,31 мкг/мл) білку з молекулярною масою 26,9 кДа, яка становить 1,6 % від загального білку (рис. 1). Щодо білкового складу віросомальної грипозної вакцини «Інфлексал», її склад був дещо відмінним від складу вказаної вище вакцини, за результатами нашого дослідження концентрація загального білку на один вірусний штам у ній дорівнювала 94,60 мкг/мл. Складові вірусних антигенів вакцини являли собою три білкових компоненти. З них 45,5 % припадали на білок з молекулярною масою 24,1 кДа у концентрації 129,1 мкг/мл; 33,0 % складала білкова компонента 78,7 кДа, що містилася у суспензії в кількості 93,6 мкг/мл, а 21,5 % загальної кількості білків були представлені складовою з молекулярною масою 71,1 кДа в кількості 61,1 мкг/мл.

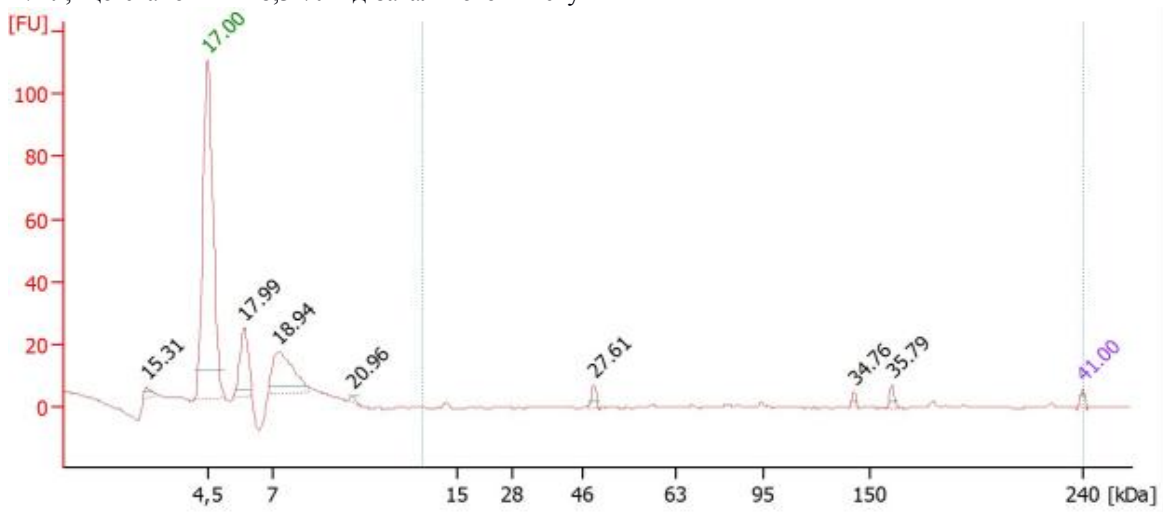

Рисунок 2 – Електрофореграма білкового складу вакцини «Інфлексал», отримана на біоаналізаторі «Agilent 2100».

Досить обмежена кількість складових вірусно-антигенного профілю вакцини «Інфлексал», а також доволі велика молекулярна маса двох з виявлених білкових компонентів дозволяє припустити, що антигенна складова даної віросомальної вакцини виготовлена за зразком субодиничних препаратів з наступною інкапсуляцією до лецитинових подвійно-шарових ліпосомальних везикул.

Висновки

1. При застосуванні ліпосомальних грипозних вакцин «Інфлексал» та «Ліпос №2» показник максимального рівня гомологічних антитіл до антигенів вірусів грипу А та В у сироватці крові був аналогічним, проте спостерігався у більшого відсотку тварин, імунізованих новоствореною вакциною: у 78 % при одноразовій імунізації та у 89 % за умови дворазового введення, що свідчить про вищий захисний потенціал експериментальної вакцини «Ліпос №2».

2. На основі даних електрофореграм, що були отримані на біоаналізаторі «Agilent 2100» визначено кількісний склад протеїнів, їх сумарну масу і відсоткове співвідношення у тривалентній субодиничній вакцині «Інфлювак» і тривалентній віросомальній вакцині «Інфлексал», що різняться кількістю складових білкових компонентів за молекулярними масами.

References

1 Flu information bulletin №211 [E-sourse]. March 2014. www. who. int/ mediacentre/factsheets/fs21.

2. Herzog C. Eleven years of Inflexal V - a virosomal adjuvanted influenza vaccine [Text]. / C. Herzog, K. Hartmann, V. Kunzi, O. Kursteiner, R. Mischler, H. Lazar, et al. // Vaccine. 2009 Jul 16. - V.27., №33. – P. 4381–4387.

3. Mischler R. Inflexal V a trivalent virosome subunit influenza vaccine: production [Text]. / R. Mischler, I.C. Metcalfe. // Vaccine. 2002 Dec 20. - V.20., №5.- P.17–23.

4. Bovier PA. Epaxal: a virosomal vaccine to prevent hepatitis A infection [Text]. / PA. Bovier // Expert Rev. Vaccines. 2008 Oct. - V.7., №8. – P.1141–1150.

5. Usonis V. Antibody titres after primary and booster vaccination of infants and young children with a virosomal hepatitis A vaccine (Epaxal) [Text]. / V. Usonis, V. Bakasenas, R. Valentelis, G. Katiliene, D. Vidzeniene, C.

Herzog // Vaccine. 2003 Nov 7. - V.21., №31. – P.4588–4592.
6. Butts C, Murray N, Maksymiuk A, Goss G, Marshall E, Soulieres D, et al. Randomized phase IIB trial of BLP25 liposome vaccine in stage IIIB and IV non-small-cell lung cancer [Text]. / C. Butts, N. Murray, A. Maksymiuk, G. Goss, E. Marshall, D. Soulieres et al. // J Clin Oncol. 2005 Sep 20. - V.23., №27. – P.6674–6681.
7. North S. Vaccination with BLP25 liposome vaccine to treat non-small cell lung and prostate cancers [Text]. / S. North, C. Butts. // Expert Rev Vaccines. 2005 Jun- V.4., №3. – P.249–57.
8. Regules JA. The RTS,S vaccine candidate for malaria [Text]. / JA. Regules, JF. Cummings, CF. Ockenhouse. // Expert Rev Vaccines. 2011 May. - V.10., №5. – P.589–599.
9. Agnandji ST. Evaluation of the safety and immunogenicity of the RTS,S/AS01E malaria candidate vaccine when integrated in the expanded program of immunization [Text]. / ST. Agnandji, KP. Asante, J. Lyimo, J. Vekemans et al. // J Infect Dis. 2010 Oct 1. - V.202., №7. – P.1076–1087.
10. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers [Text]. / VP. Torchilin // Nat Rev Drug Discov.2005 Feb. - V.4., №2. – P.145–160.
11. Tollemar J. Liposomal amphotericin B (AmBisome) for fungal infections in immunocompromised adults and children [Text]. / J. Tollemar, L. Klingspor, O. Ringden. // Clin Microbiol Infect. 2001. - V.7., №2. – P.68–79.
12. Stewart S, Randomized comparative trial of pegylated liposomal doxorubicin versus bleomycin and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma [Text]. / S. Stewart, H. Jablonowski, FD. Goebel, K. Arasteh, et al. // International Pegylated Liposomal Doxorubicin Study Group. J of Clinical Oncology. 1998. - V.16., №2. – P.683–691.
13. Fries LF. Liposomal malaria vaccine in humans: a safe and potent adjuvant strategy [Text]. / LF. Fries, Gordon DM, Richards RL, Egan JE, et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jan 1. - V.89., №1. – P.358–362.
14. Agnandji ST, First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children [Text]. / ST Agnandji, B. Lell, SS. Soulanoudjingar, JF. Fernandes, BP. Abossolo, C. Conzelmann, et al. // N Engl J Med. 2011 Nov 17. - V.365., №20. – P.1863–1875.
15. Europian Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes [Text]. Strasburg: Council Treaty Series; 1986. - 123 p.
16. Lapach SN. Statistical methods in medical-biological studies using Excel. / SN. Lapach. - Kyiv: Morion., 2004. – p.
17. Buktimirov TA. Methods for determination of quality of immunobiological preparations for the prevention and diagnosis of influenza: Guidance. / TA. Buktimirov, NI. Lonskaya, NA. Agafonova, et al. - M.: Federal Centre for Sanitary Inspection Ministry of Health of Russia, 2003 – 32 p.
18. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [Text] / Laemmli U. K. / Nature.-1970. –V.227. – P.680-685.
19. Osterman L. A. Methods of study of proteins and nucleic acids [Text] / L. A. Osterman. –M.: MCCMI, 2002. - 248 p.
20. Method of spectrophotometric determination of concentration of Liposomally bagged pharmaceutical preparations. Patent RF №2337358, Date of publication 27.10 2008, Application 03.04.2007. Filinova EJ., Kiselev SM, Solov'ev AI.
21. Chaloupka I. Coparative analisis of six European influenza vaccines [Text] / I. Chaloupka., A. Schuler, M. Marshall. // Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. – 1996. – V.15. – P.121-127.

UDC 615.371:57.083.2

COMPARED OF IMMUNOGENESITY AND PROTEIN COMPOSITION OF EXPERIMENTAL AND OFFICINAL VYROSOMAL INFLUENZA VIRUS VACCINE

Volyanskiy AYu, Pogorila MS, Romanova EA, Davidova TV, Martynov AV, Igumnova NI, Sidorenko TA, Yukhimenko VI, Peremot SD, Smilianska MV, Kashpur NV

Introduction Due to the high mutagenicity that distinguishes influenza A virus, there are viruses of this type of new antigenic properties, the prevention of which the immune system has no immunological memory. It is therefore important to find new ways to create and study patterns of immunological impact of influenza vaccines. The success of liposomal vaccines and the growing interest in their improvement can be attributed to a number of key advantages over other systems of delivery of antigens and enhance the immune response. The main advantage of liposomes is their safety and good tolerance, as demonstrated by the use of approved based on liposomes of anticancer and anti-infective drugs.

Material and methods As part of the search for new ways to create, study functional characteristics and patterns of immunological impact of influenza vaccine immunogenicity was investigated newly formed liposomal vaccine "Lipos 2" compared to the trivalent vaccine officinal virosomal vaccine Infleksal and analyzed their protein composition using bioanalyzer «Agilent 2100." Immunogenicity of vaccines studied by hemagglutination inhibition test (HIT) with a specific antigen (influenza virus). The composition of proteins containing vaccine was studied using bioanalyzer «Agilent-2100» («Agilent Technologies», USA) using the method of SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Analysis on «Agilent-2100" conducted by using chips to analyze 12 samples simultaneously studied vaccines. The protein composition of the vaccine was determined by elektrophoregram receiving data on molecular weight protein fragments, their concentration and percentage of study medication. Also, determine the average number of proteins in vaccine strain.

Results and discussion Considerable experimental vaccine immunogenicity, which caused a persistent increase in the level of specific antibodies to all three viral antigens in most experimental animals compared with the vaccine, which was in control. Based elektroforegram defined the quantitative composition of proteins, their total weight and percentage of trivalent subunit vaccine Inflyuvak and

trivalent virosomal vaccine Infleksal, that the number of components of different protein components by molecular weight.
Keywords: virosomal trivalent influenza vaccine, protein composition, immunogenicity.