

## Enhancing the immunogenic activity of Influvac vaccine in the use of adjuvant TI complexes modified by echinochrome A

A. V. Tsybul'sky<sup>1</sup>, A. M. Popov<sup>2</sup>, A. A. Artyukov<sup>2</sup>, A. N. Mazeika<sup>1</sup>, E. A. Kostetsky<sup>1</sup>, N. M. Sanina<sup>1</sup>, O. N. Krivoshepa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Far Eastern Federal University; <sup>2</sup>Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok

The self-assembly of marine macrophyte glycolipids, holothurian saponin, and cholesterol gave rise to nanoscale morphological structures called tubular immunostimulating (TI) complexes. Whether the latter could be used on the basis of vaccine preparations containing the influenza virus subunit antigens was studied. There was an obvious increase in the immunogenicity of influenza virus hemagglutinin when the experimental animals were immunized with this antigen as part of TI complexes. It was shown that the adjuvant activity of the TI complex to influenza virus hemagglutinin could be enhanced by adding the known antioxidant echinochrome A from a sand-dollar (*Echinarachnius parma*) to the matrix of the TI complex.

Key words: vaccines, tubular immunostimulating complex, ISCOM, triterpene glycosides, 1,4-naphthoquinones, lipids, adjuvants

Вакцинные препараты, построенные из субъединичных природных вирусных белков или из генно-инженерных либо химически синтезированных антигенов, являются более безопасными в сравнении с цельновирионными или сплит-вакцинами. Однако они, как правило, индуцируют менее выраженный специфический иммунный ответ, сила которого может быть недостаточной для обеспечения эффекта протективности. С целью повышения иммуногенности таких вакцин используются различные технологические подходы, в частности предусматривающие использование адъювантных носителей липидной природы типа липосом и иммуностимулирующих комплексов (ИСКОМ), основой которых является липид-сапониновая матрица (ЛСМ), способная включать в свой состав белковые антигены, имеющие гидрофобные или амфифильные свойства [3, 6].

Известно, что процессы иммунологического распознавания чужеродных антигенов в значительной степени зависят от формы пространственной организации вирусных антигенов [5]. Коллоидные и мультимерные формы субъединичных вакцин могут имитировать естественную форму презентации антигенов и в результате обладают повышенной иммуногенностью в сравнении с обычной растворимой формой антигенов. Включение вирусных белков в липидные суперструктуры типа липосом и ИСКОМ позволяет увеличить их иммуногенность за счет более эффективной презентации антигена иммунокомпетентным клеткам, сочетания антигена с адъювантными компонентами, а также защиты антигена от действия протеолитических ферментов внутренней среды организма и обеспечения, таким образом, эффекта пролонгации антигенного раздражения.

Особенно актуальным является создание эффективных и безопасных вакцинных препаратов, способных обеспечить быстрое формирование протективного иммунного ответа к инфекционным агентам, вызывающим поражение большого процента населения при эпидемических вспышках. К таким эпидемически значимым возбудителям относятся вирусы гриппа, борьба с которыми ведется уже длительное время. Имеется большой арсенал вакцин различного типа, однако проблема контроля гриппозной инфекции по-прежнему актуальна и даже обостряется в последние годы ввиду опасности образования вирусных рекомбинантных мутантов. В связи с вышеперечисленными тенденциями особый интерес представляет

разработка вакцинных препаратов, способных индуцировать сравнительно быстрый, но эффективный и длительный иммунный ответ. Решение подобной проблемы вряд ли возможно без применения адъювантного сопровождения в отношении гриппоспецифических антигенов. Многообещающим подходом в этом направлении является использование в качестве адъювантов различных ЛСМ. ИСКОМ уже более 20 лет считаются одними из самых перспективных носителей и адъювантов для антигенов. Однако реальное применение в клинике инфекционных заболеваний человека и животных они пока не получили ввиду известного побочного действия ИСКОМ – гемолитической активности сапонинов Quilla, необходимых для формирования ЛСМ в присутствии полярных липидов и холестерина [3, 6]. В значительной степени эти проблемы решены нами путем замены сапонинов Quilla на структурно охарактеризованный индивидуальный тритерпеновый гликозид кукумариозид A<sub>2</sub>-2 (КД), выделенный из дальневосточной голотурии *Cucumaria japonica* [1]. КД оказался способным в присутствии фосфо- или гликолипидов и холестерина к формированию тубулярного типа суперструктур, названных нами тубулярными иммуностимулирующими комплексами (ТИ-комплексами) [3, 4]. При этом замена фосфолипида на гликолипид моногалактозилдиацилглицерол (МГДГ), выделенный из различных морских макрофитов, приводила к усилению иммуноадъювантной активности таких модифицированных комплексов в отношении бактериального антигена – порового белка из *Yersinia pseudotuberculosis* [4].

В данной работе впервые проведена оценка иммуноадъювантной активности ТИ-комплексов в отношении субъединичных вирусспецифических антигенов. Исследована способность этих носителей встраивать антигены субъединичной вакцины Инфлювак в ЛСМ. Изучена также возможность повышения адъювантной активности ТИ-комплексов путем дополнительного встраивания в ЛСМ молекул эхинохрома А (ЭХА), обладающих антиоксидантной активностью и способных повышать устойчивость липидсодержащих ТИ-комплексов к перекисному окислению.

### Материалы и методы

В работе использовали крыс линии Вистар (самки массой 220–250 г). Животные содержались в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используе-

мых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

МГДГ получали из морской травы *Ulva fenestrata* согласно данным в работе [3].

КД (кукумариозид  $A_2-2$ ) – тритерпеновый гликозид из *S. japonica* был любезно предоставлен В. М. Богуславским (лаборатория химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН (зав. лабораторией акад. РАН В. А. Стоник).

ТИ-комплексы получали методом гидратации липидных пленок [4].

В качестве антигена (АГ) использовали вакцинный препарат Инфлювак (“Solvay Pharma”, Нидерланды), содержащий субъединичные антигены гемагглютинин (ГА) вирусов гриппа типов А и В в дозе 90 мкг/мл и нейраминидазу. Дозировку вирусных АГ определяли по содержанию ГА. Введение АГ в ТИ-комплексы осуществляли путем добавления раствора смеси АГ вакцины Инфлювак к суспензии ЛСМ [4]. Для исследования включения АГ в ТИ-комплексы были приготовлены препараты состава МГДГ-холестерин-КД-АГ (соотношение 6:2:3:1,5 по массе). Полученные препараты ТИ-комплексов с вакцинными АГ центрифугировали в течение 25 мин (6000 г при комнатной температуре). Концентрацию несвязанного белка определяли в супернатанте по методу Лоури. Эффективность включения АГ в ТИ-комплексы контролировали по активности ГА в реакции гемагглютинации (РГА). В качестве тест-системы использовали 0,5% взвесь эритроцитов человека группы 0 (I). Эффективность включения нейраминидазы не оценивали.

Морфологию ЛСМ и ТИ-комплексов (ЛСМ с антигеном) изучали с помощью метода трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) при негативном контрастировании фосфорновольфрамовокислым калием (ФВК). Исследование образцов и фотографирование проводили на трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100S (“Jeol”, Япония).

Модификацию матрицы ТИ-комплексов производили ЭХА – полигидроксинафтохиноном, выделенным из плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*, по разработанной ТИБОХ ДВО РАН технологии. ЭХА добавляли к матрице одновременно с АГ. При иммунизации животных модифицированными ТИ-комплексами дозы ЭХА были эквивалентны 4 мг на 1 кг массы тела.

Сформированы 5 экспериментальных групп по 10 животных в каждой: К – контрольная группа крыс, получавших только инъекцию фосфатно-солевого буфера (ФСБ); АГ – крысы, иммунизированные антигенами вакцины; (АГ + ТИ) – крысы, иммунизированные антигенами вакцины в составе ТИ-комплексов; (АГ + ТИ + ЭХА) – крысы, иммунизированные антигенами вакцины в составе ТИ-комплексов, модифицированных ЭХА; (АГ + ЭХА) – крысы, иммунизированные антигенами вакцины в смеси с ЭХА.

Животных иммунизировали однократно подкожно (п/к) в дозе, соответствующей 1 мкг ГА на крысу (в объеме 0,2 мл ФСБ).

Содержание специфических антител определяли в сыворотке крови крыс через 10 и 30 сут после иммунизации методом иммуноферментного анализа (ИФА). Сенсибилизацию твердой фазы производили антигенами вакцины Инфлювак из расчета 1 мкг ГА на лунку 96-луночного планшета. Концентрацию

антител выражали в единицах оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм. Параллельно исследуемые сыворотки крови тестировали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) по общепринятой методике. Титры антигемагглютинирующих антител выражали в log по основанию 2.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием прикладной программы SPSS 11/0 с определением критерия достоверности Фишера–Стьюдента. Различия между двумя средними считали достоверными при  $p < 0,05$ . Уровень надежности составлял 95% и более.

## Результаты и обсуждение

При изучении включения АГ в ТИ-комплексы установлено, что белковые АГ вакцины Инфлювак включаются в состав ТИ-комплексов с высокой эффективностью. При весовом соотношении 1 часть ТИ-комплексов и 0,5 части АГ (расчет проводили по содержанию ГА) эффективность включения вакцинных белков составила 72%. Гемагглютинирующая активность ТИ-комплексов, сенсибилизированных вирусными АГ, составляла 86,7% от соответствующей активности вакцины Инфлювак, взятой в объеме, эквивалентном добавленному к ТИ-комплексам. Это позволяет говорить о возможности построения вакцинных конструкций на основе ТИ-комплексов и субъединичных вирусных АГ. Тот факт, что ТИ-комплексы, сенсибилизированные АГ, проявляют 86,7% гемагглютинирующей активности относительно исходного препарата Инфлювака (при 72% общей эффективности включения белков), позволяет предположить, что происходит более интенсивное включение именно ГА в сравнении с нейраминидазой и сопутствующими альбуминами.

Гемагглютинирующая активность ТИ-комплексов, сенсибилизированных вакцинными АГ, сохранялась не более 1 мес в условиях хранения приготовленного препарата при 4°C. При увеличении срока хранения комплекс проявляет признаки неустойчивости и легко подвергается деградации. Очевидно, это является следствием большой молекулярной массы (м. м.) вакцинных АГ и их амфифильных свойств. При использовании АГ с гидрофобными свойствами и меньшей м. м. (например, субъединичного мономера порового белка *Yersinia pseudotuberculosis*, имеющего м. м. 30 кДа) комплекс сохраняет свою активность более 6 мес. Можно предположить, что использование отдельных эпитопов вирусных АГ с относительно небольшой м. м. позволит получать вакцинные препараты на основе ТИ-комплексов, способные к длительному сохранению своей иммуногенной активности.

Механизм встраивания АГ вакцины Инфлювак в ТИ-комплексы требует отдельного детального изучения. На данном этапе, учитывая большую м. м. и амфифильные свойства вакцинных АГ, можно предположить, что реализуются механизмы адсорбционного типа преимущественно за счет водородных связей и, возможно, ионных взаимодействий молекул АГ с сульфатными группами КД, входящего в состав ТИ-комплексов.

Исследование препаратов ТИ-комплексов, содержащих вакцинные АГ, методом ТЭМ показало, что на торцах частиц возникают характерные “шапочки” (рис. 1).

Молекулы ГА при встраивании в ТИ-комплексы, очевидно, подвергаются определенным конформа-

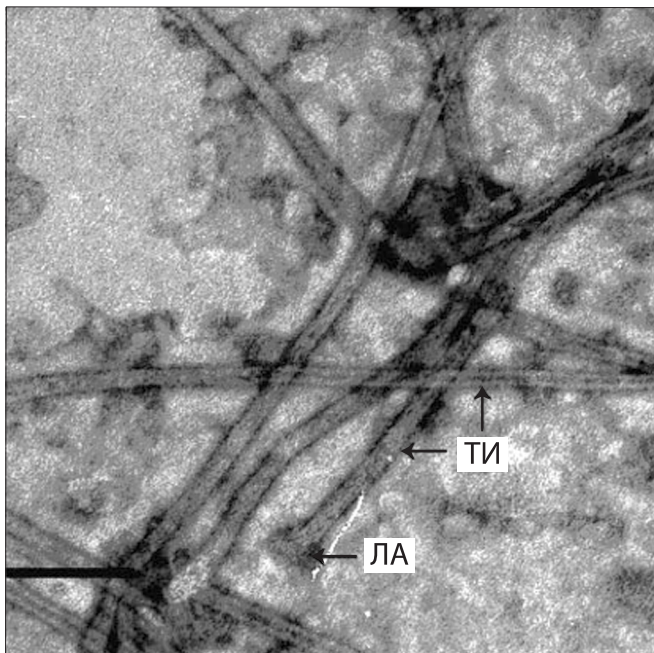


Рис. 1. Электронная микрофотография ТИ-комплексов, нагруженных антигенами вакцины Инфлювак.

Метод: ТЭМ. Окрашивание: негативное контрастирование ФВК. Калибровочная шкала 100 нм. Ув. 160 000. ТИ – ТИ-комплексы; ЛА – локализация антигена в ТИ-комплексах.

ционными изменениями. Однако их активные центры остаются функциональными: они сохраняют гемагглютинирующую способность. При этом гемагглютинирующая активность препаратов ТИ-комплексов определяется количеством введенного в них ГА. Способность ГА в составе ТИ-комплексов агглютинировать эритроциты свидетельствует о локализации молекул ГА на внешней поверхности ТИ-комплексов. Вероятным местом локализации этого АГ являются “шапочки”, появляющиеся на ТИ-комплексах с АГ и отсутствующие на частицах ЛСМ.

В экспериментах *in vivo* показано, что иммунизация животных вакциной Инфлювак вызывает индукцию гуморального иммунного ответа, приводящего к образованию специфических антител, определяемых в

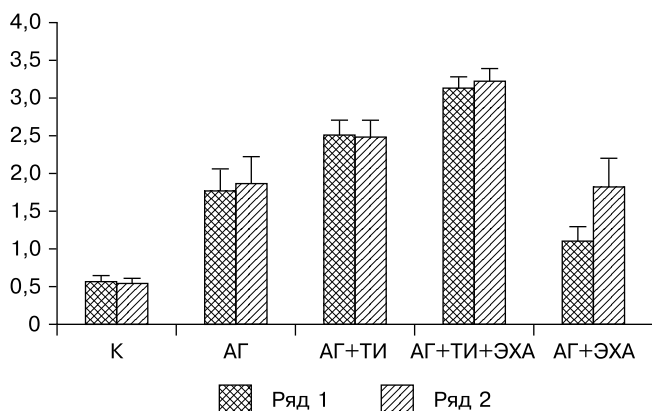


Рис. 2. Содержание противогриппозных антител в сыворотке крови крыс линии Вистар через 10 и 30 дней после иммунизации антигенами вакцины Инфлювак из расчета 1 мкг ГА/мышь.

По оси абсцисс – экспериментальные группы животных (см. в тексте). По оси ординат – ОП при 450 нм.

Ряд 1 – данные, полученные через 10 сут после иммунизации; ряд 2 – данные, полученные через 30 сут после иммунизации.

сыворотке животных методом ИФА через 10 дней после однократной иммунизации (рис. 2).

Иммунный ответ не характеризовался высокой напряженностью, имел место умеренный прирост антител. В параллельно поставленной РТГА титр антител составлял  $7,9 \pm 0,6 \log_2$ . Иммуногенность вакцины при таком режиме иммунизации можно охарактеризовать как умеренную.

В случае иммунизации АГ в составе ТИ-комплекса иммунный ответ был более выраженным ( $p < 0,05$ ). Разница в содержании противовирусных антител сохранялась и через 30 дней после иммунизации, однако уже не была статистически достоверной (см. рис. 2). Таким образом, применение ТИ-комплексов позволяет достигнуть именно более раннее и более интенсивное развитие гуморального иммунного ответа при использовании малых доз АГ вакцины.

В целях усиления адъювантных свойств ТИ-комплекса произведена его модификация: в его структуру был дополнительно введен нафтохиноновый препарат ЭХА, обладающий широким спектром медико-биологической активности, но наиболее известный как природный антиоксидант [2, 7]. Комбинация ТИ-комплекса с ЭХА оказалась более эффективной адъювантной конструкцией в отношении АГ вакцины, приводя к повышению при экспериментальной иммунизации уровня специфических антител ( $p < 0,01$ ). Повышенные титры противогриппозных антител в этой группе сохранялись и через 30 дней после иммунизации (см. рис. 2). Данный эффект молекул ЭХА, обладающих высоким сродством к липидам, по-видимому, обусловлен его стабилизирующим действием на липидные компоненты ТИ-комплексов, имеющие высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот [3]. Благодаря предотвращению перекисного окисления липидов происходит общая стабилизация ТИ-комплекса и защита АГ от действия протеолитических ферментов внутренней среды организма. В результате может иметь место пролонгация экспозиции АГ и усиление иммунного ответа.

Такая трактовка эффекта ЭХА в составе ТИ-комплекса обусловлена тем обстоятельством, что ЭХА не проявил самостоятельную адъювантную активность. При иммунизации животных смесью АГ и ЭХА иммунный ответ на вакцинные АГ оказался более слабым, чем в случае иммунизации только АГ. Эта негативная тенденция проявлялась через 10 дней после иммунизации, а к 30-м суткам исчезала, в результате чего уровень иммунного ответа оказывался сопоставимым с показателями животных, иммунизированных только АГ. Наиболее вероятно, что этот транзитный эффект торможения антителогенеза обусловлен ярко выраженными антиоксидантными и противовоспалительными свойствами ЭХА [2, 7], приводящими в итоге к снижению специфического иммунного ответа как гуморального, так и клеточного типа (это ранее было подтверждено нами в серии работ по иммунизации экспериментальных животных стандартным тест-антигеном – эритроцитами барана).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов установлено, что АГ вакцины Инфлювак способны встраиваться в ТИ-комплексы, сохраняя при этом свою иммуногенность и гемагглютинирующую

щую активность. ТИ-комплексы, являясь носителем и адьювантом для этих АГ, обеспечивают усиление специфического иммунного ответа гуморального типа. Встраивание ЭХА в ТИ-комплексы приводит к повышению их иммуноадьювантного потенциала путем активации гуморального звена иммунного ответа. При этом ЭХА не проявляет собственную иммуноадьювантную активность в отношении АГ вируса гриппа.

Результаты работы подтверждают возможность использования ТИ-комплексов как носителя и адьюванта для комплекса АГ вакцинного препарата Инфлювак, содержащего субъединичные АГ вируса гриппа. Логическим развитием полученных в данной работе результатов будет проведение дальнейших экспериментов, посвященных возможности построения на основе ТИ-комплексов вакцинных препаратов, содержащих индивидуальный гриппоспецифический ГА и его отдельные эпитопы.

Работа поддержана грантом Правительства РФ (ГК № 11.G34.31.001) и грантом аналитической ведомственной целевой программы “Развитие научного потенциала высшей школы” (2009–2010 гг.) по проекту № 2.2.2/603.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Авилон С. А., Стоник В. А., Калиновский А. И. Строение четырех новых тритерпеновых гликозидов из голотурии *Cucumaria japonica* // Химия природных соединений. – 1990. – № 6. – С. 787–792.
2. Кривошапко О. Н., Попов А. М., Артюков А. А. Применение биоантиоксидантов при нарушениях липидного и углеводного обмена // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2009. – № 4–5. – С. 85–88.
3. Лу И. А., Попов А. М., Цыбульский А. В. и др. Иммуностимулирующие свойства липид-гликозидного носителя антигена на основе кукумариозида А2-2 и моногалактозилдиацилглицерола из морских водорослей // Прикладная биохимия и микробиол. – 2008. – Т. 44. – С. 694–700.
4. Цыбульский А. В., Санина Н. М., Лу И. А. и др. Разработка нового адьювантного липид-сапонинового комплекса и его применение при экспериментальной иммунизации бактериальным антигеном // Биомед. химия. – 2007. – Т. 53. – С. 297–306.
5. Josef C., Van Nguyen T., Jeong K. et al. Systemic and intestinal antibody secreting cell responses and protection in gnotobiotic pigs immunized orally with attenuated Wa human rotavirus and Wa 2/6-rotavirus-like-particles associated with immunostimulating complexes // Vaccine. – 2002. – Vol. 20. – P. 1741–1753.
6. Kersten G. F. A., Crommelin D. J. A. Liposomes and ISCOMS as vaccine formulations // Biochim. Biophys. Acta. – 1995. – Vol. 1241. – P. 117–138.
7. Lebedev A. V., Ivanova M. V., Levitsky D. O. Echinochrome, a naturally occurring iron chelator and free radical scavenger in artificial and natural membrane systems // Life Sci. – 2005. – Vol. 76. – P. 863–875.

Поступила 21.06.11

© Т. М. СОКОЛОВА, А. Н. ШУВАЛОВ, 2012  
УДК 615.373:578.245|03:616.98:578.833.1|.036.8

Т. М. Соколова<sup>1,2</sup>, А. Н. Шувалов<sup>2</sup>

## Подавление рекомбинантным альфа-2-интерфероном репродукции вируса карельской лихорадки в клетках крови человека

<sup>1</sup>ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития России, <sup>2</sup>ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития России, Москва

Впервые показана активная репликация вируса карельской лихорадки (ВКЛ) в клетках крови человека и профилактическое защитное действие отечественного препарата реаферон. ВКЛ обладал высокой чувствительностью к альфа-ИФН. В контрольных (незараженных клетках) реаферон вызывал низкие уровни экспрессии генов ИФН-зависимых ферментов дсРНК-зависимой протеинкиназы (дсПК) и 2'5'-олигоаденилатсинтетазы (ОАС), мало влияя на активность генов своего семейства. ВКЛ подавлял индуцированную реафероном экспрессию генов ИФН-зависимых ферментов, но в обработанных реафероном зараженных клетках транскрипция генов альфа-ИФН возрастала.

Ключевые слова: вирус карельской лихорадки, реаферон, клетки крови человека

### Recombinant interferon- $\alpha$ suppression of Karelian fever virus replication in human blood cells

Т. М. Sokolova<sup>1,2</sup>, А. N. Shuvalov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of Russia; <sup>2</sup>N. F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health and Social Development of Russia, Moscow

The active replication of Karelian fever virus (KFV) in human blood vessels and the protective activity of the Russian agent reafeeron were first shown. KFL was highly susceptible to interferon (IFN)- $\alpha$ . In control (uninfected) cells, reafeeron caused low gene expressions of the IFN-dependent enzymes dsRNA-dependent protein kinase and 2'5'-oligoadenylate synthetase, by exerting a little effect on the activity of its family genes. KFV suppressed the reafeeron-induced gene expression of IFN-dependent enzymes, but IFN- $\alpha$  gene transcription was increased in the reafeeron-treated infected cells.

Key words: Karelian fever virus, reafeeron, human blood cells

Контактная информация:

Соколова Татьяна Михайловна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр.; e-mail: tmsokolovavir@mail.ru