УДК 577.352.24:615.371:616.921.5

ЛИПОСОМАЛЬНАЯ АНТИГРИППОЗНАЯ ВАКЦИНА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Н.Н. Иванова[1], А.Ю. Волянский[2]

[1]ГУ "Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины"

[2]ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И. Мечникова НАМН Украины»

Резюме. *Липосомальная антигриппозная вакцина была разработана для того, чтобы преодолеть основные недостатки, используемых в настоящее время вакцин против гриппа: их относительно низкую эффективность и необходимость ежегодных прививок. Разработанная липосомальная вакцина состоит из оригинальной композиции липосом, содержащих вирусные белки гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA). Введение экспериментальной липосомальной вакцины продуцировало появление специфических антител в 3 раза выше после первой вакцинации и в 2 раза выше после второй вакцинации по сравнению с вакциной Panenza. Вакцина Panenza состоит из 5 белков, экспериментальная липосомальная вакцина содержит только 2 белковых компонента, что снижает риск аллергических явлений. Использование нейтральных лецитиновых липосом, нагруженных антигеном, незначительно увеличивало количество антител, поэтому для создания экспериментальной антигриппозной вакцины были использованы липосомы на основе смеси отрицательно заряженных липидов.*

Ключевые слова: *липосомы, гемагглюттинин, нейроминидаза, вакцина Panenza.*

ВВЕДЕНИЕ

У наночастиц есть естественные мишени в организме: клетки моноцитарно-макрофагальной системы (их также называют клетками ретикуло-эндотелиальной системы, РЭС). Это профессиональные фагоциты; их основная функция - поглощать бактерии и вирусы, чтобы разрушить эти чужеродные агенты, а их части представить на своей поверхности для формирования иммунного ответа. Указанное свойство наночастиц используют при конструировании вакцин. Так как обсуждаемые клетки являются антиген-представляющими, то загрузка наночастиц антигеном болезнетворного микроорганизма (вируса или бактерии) приводит к избирательной доставке этого антигена в антиген-представляющую клетку естественным путем. Этот прием очень эффективен: в случае использования липосомальных вакцин иммунный ответ усиливается в следствие того, что антигены, ассоциированные с липосомами попадают непосредственно в антигенпредставляющие клетки. Наиболее эффективный способ предотвратить серьезные последствия гриппа и значительные экономические потери является вакцинация лиц, подвергающихся риску, до начала эпидемии. Размеры липосом варьируются от 0,01 мкм до 150 мкм. Антигены могут в растворенном виде находиться внутри липосом

или находиться в составе липосомальной мембраны, либо могут быть прикреплены к ней. Липосомы обеспечивают снижение токсичности антигенов и способствуют их длительному обращению. На фармацевтическом рынке уже есть несколько липосомных вакцин для людей и домашних животных [2, 3].

Целью этой работы является получение липосомальной вакцины, содержащей гемагглютинин и нейромидазу, против вируса гриппа А (H1N1).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение липосом: липосомы были получены на основе природных липидов: яичного лецитина («Фармстандарт- Биолек», Украина) и смеси липидов с высоким отрицательным зарядом и оригинальной структурой, разработанной Ивановой Н.Н. Липосомы были получены путем выпаривания липидов с белками: гемагглютинином (ГА) и нейромидазою (НА) («НИИ вакцин и сывороток», Россия) на роторном вакуумном испарителе. Полученная липидно-белковая пленка суспендировалась в стерильном физиологическом растворе. Липосомы формировались в экструдере EmulsiFlex-C5 (Канада «Avestin»), продавливанием сжатым воздухом до достижения постоянной оптической плотности на спектрофотометре (DU–7 Spectrophotometer Beckman, USA) при температурах выше фазы перехода температуры любого липидного компонента, который присутствовал в липосомах. Средний размер липосомы составлял 160 – 180 нм [1].

Экспериментальные группы животных: Работа с экспериментальными животными проводилась с соблюдением морально-этических принципов проведения биомедицинских экспериментов на животных, сформулированых Международным советом медицинских научных обществ (CIOMS) в Этическом кодексе, включающем раздел «Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных. Все болезненные процедуры были проведены с обезболиванием.

Для эксперимента животные были разделены на группы: контроль и экспериментальные. Были сформированны группы по 30 мышей, весом 18-20 г в каждой группе. Все экспериментальные и контрольные группы были заражены штаммом вируса гриппа (H1N1), адаптированного для мышей. Экспериментальные группы животных были вакцинированы липосомальными вакцинами. Одна контрольная группа животных была вакцинирована вакциной Panenza (Aventis, Франция), второй контрольной группе животных был введен физиологический раствор. Иммунизация животных была проведена в дозе 0,3 мл внутрюбрюшинно. Вторая иммунизация животных была проведена в этих же дозах после 14 дней. Животные наблюдались в течение 30 дней. Часть животных была извлечена из эксперимента на 14-й день после иммунизации, остальные на 30 день. Во всех группах животных было определено количество антител в сыворотке крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Иммунизация экспериментальных животных была проведена двумя липосомальными вакцинами: на основе лецитина с нейтральным зарядом и на основе смеси липидов с большим отрицательным зарядом. Иммунизация контрольных групп животных была проведена коммерческой вакциной Panenza и физиологическим раствором. Для оценки протективного иммунитета экспериментальные и контрольные мыши были заражены летальной дозой вируса гриппа на 21 день после прививки вакцинами. Была проведена регистрация уцелевших подопытных животных и их вес. Экспериментальные группы мышей были защищены от инфекции высоких доз вируса гриппа и не потеряли вес в период наблюдения. Однако титры специфических антител к вирусу А (HIN1) после иммунизации подопытных животных вакцинами отличались (табл.1). Контрольная группа животных, иммунизированных физиологическим раствором, полностью погибла на протяжении 11 дней после заражения.

Таблица 1

Титры специфических антител к вирусу A (HIN1) после иммунизации экспериментальных животных антигриппозными вакцинами

Антигриппозная вакцина	Титры специфических антител к вирусу гриппа A (HIN1) после первой иммунизации	Титры специфических антител к вирусу гриппа A (HIN1) после второй иммунизации
Экспериментальная липосомальная вакцина на основе липидов с отрицательным зарядом	1:240	1:360
Экспериментальная липосомальная вакцина на основе лецитина	1:120	1:160
Коммерческая вакцина Panenza	1:80	1:160

Титры специфических антител к вирусу A (HIN1) после первой иммунизации животных липосомальной вакциной на основе липидов с отрицательным зарядом были выше титров специфических антител, полученных при иммунизации животных липосомальной вакциной на основе лецитина и вакциной Panenza. Введение экспериментальной липосомальной вакцины с отрицательным зарядом продуцировало образование специфических антител в 3 раза выше после первой вакцинации, и в 2 раза выше после второй вакцинации в сравнении с вакциной Panenza.

ВЫВОДЫ

Иммунизация животных липосомальной антигриппозной вакциной с отрицательным зарядом продуцировала высокие титры антител, превышающие титры антител, полученных при использовании липосомальной вакцины на основе лецитина и коммерческой вакцины Panenza. Иммуногенность этой вакцины была в 3 раза выше после первой иммунизации и в 2 раза выше после второй иммунизации в сравнении с коммерческой сплит вакциной Panenza, которая состоит из 5 белковых компонентов. Липосомальная вакцина на основе отрицательно заряженных липидов содержала только 2 белковых компонента, что уменьшало риск появления аллергических явлений.

Таким образом, было показано, что иммунизация лабораторных мышей новой липосомальной вакциной приводит к индукции защитного иммунного ответа против гриппа. Привитые этой вакциной экспериментальные животные были полностью защищены от инфекции смертельной дозы вируса гриппа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фосфолипиды. Методы их выделения, обнаружения и изучения физикохимических свойств липидных дисперсий в воде: Учебно-методическое пособие по биоорганической химии [Текст]; под. ред. Г. М. Сорокоумова, А. А. Селищева, А. П. Каплун.– Москва, 2000.– 105 с.

2. Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems [Text] / G Gregoriadis //Trends Biotechnol. – 1995. – V. 13. – P. 527-537.

3. Holm K.J. Liposomal Influenza Vaccine [Text] / K.J. Holm, K.L. Goa // BioDrugs . – 1995. – V.11. – P. 137-144.

REFERENCES

1. Phospholipidy. Metody ih vydeleniya, obnaruzeniya i izucheniya phisikochimicheskih svoistv lipidnyh dispersiy v vode: Uchebno-metodicheskoye posobie po bioorganicheskoy chimii [Phospholipids. Selection methods, detection and study of the physico-chemical properties of lipid emulsions in water] (2000). *Educational and methodical allowance for Bioorganic chemistry; under. ed. G. M. Sorokoumova, A. A.. Selishcheva, A. P. Kaplun*. Moscow,105 p.

2. Gregoriadis, G. (1995). Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol.* 13, 527-537.

3. Holm, K.J. Goa, K.L. (1995). Liposomal Influenza Vaccine. *BioDrugs,* 11, 137-144.

ЛІПОСОМАЛЬНА АНТИГРИПОЗНА ВАКЦИНА (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

Іванова Н.М.[1], Волянський А.Ю.[2]

[1]ДУ "Інститут дерматології та венерології НАМН України"

[2]ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. Мечнікова НАМН України»

Резюме. *Ліпосомальна антигрипозна вакцина була розроблена з метою подолання основних недоліків вакцин, що використовуються в даний час: їх відносно низьку ефективність і необхідність щорічної імунізації. Розроблена експериментальна ліпосомальна вакцина складається з оригінальної композиції ліпосом, що містять вірусні зовнішні білки гемаглютиніну (НА) і нейрамінідази (NA). Введення експериментальної ліпосомальної вакцини викликало появу спе-*

THE LIPOSOMAL ANTIINFLUENZAL VACCINE (EXPERIMENTAL RESEARCH)

Ivanova N.N.[1], Volunsky A.Ju.[2]

[1]SE "Institute of Dermatology and Venereology of NAMS of Ukraine",

[2]SE " Mechnicov Institute of Microbiology and Immunology of NAMS of Ukraine"

Abstract. *The liposomal antiinfluenzal vaccine was developed with the objective of overcoming the major drawbacks of the currently used influenza vaccines: their relatively low efficacy and the need for annual immunization. Developed the experimental liposomal vaccine consists of the original composition of liposomes containing the viral surface proteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). The introduction of the experimental liposomal antiinfluenzal vaccine caused the appearance of specific antibodies in 3 times higher after the first*

цифічних антитіл у 3 рази вище після першого щеплення і у 2 рази вище після другого щеплення порівняно з вакциною Panenza. Panenza складається з 5 білкових компонентів, експериментальна ліпосомальна вакцина містить тільки 2 білкових компоненти, що зменшує ризик алергічних явищ. Використання нейтральних лецитинових ліпосом, навантажених антигеном, незначною мірою збільшувало кількість антитіл, тому для створення експериментальної антигрипозної вакцини були використані негативно заряджені липосоми.

Ключові слова: *ліпосоми, гемаглютинін, нейрамінідаза, вакцина Panenza.*

immunization and 2 times higher after the second immunization in comparison with antipandemic split vaccine Panenza. Panenza consists of 5 albuminous components, our experimental vaccine contains only 2 albuminous components that reduces risk of the allergic phenomena. The use of neutral liposomes on the basis of egg lecithin loaded antigen slightly increased the number of antibodies, so for creating experimental antiinfluenzal vaccine was used negatively charged liposomes.

Key words: *liposomes, hemagglutinin, neuraminidase, vaccine Panenza.*

Об авторах:

Иванова Нина Николаевна – кандидат хим. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии, патоморфологии и молекулярной генетики ГУ „Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины”

Волянский Андрей Юрьевич – доктор мед.наук, заведующий лабораторией иммунореабилитации ГУ « Институт микробиологии и иммунологии им. И. Мечникова НАМН Украины»