

УДК 616.932:615.371:546.59:541.182

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИТЕЛ К ПРОТЕКТИВНЫМ АНТИГЕНАМ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА, КОНЪЮГИРОВАННЫМ С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА

© 2020 г. Л. А. Дыкман^{1,*}, О. А. Волох², О. В. Громова², О. С. Дуракова², С. А. Воробьева², М. Н. Киреев², Л. Ф. Ливанова², А. К. Никифоров², С. Ю. Щеголев¹, академик РАН В. В. Кутырев²

Поступило 29.05.2019 г.

После доработки 29.05.2019 г.

Принято к публикации 29.05.2019 г.

Синтезированы конъюгаты наночастиц золота с антигенами холерного вибриона. Проведена иммунизация животных полученными конъюгатами, получены кроличьи поликлональные антитела к исследуемым антигенам, показавшие высокую специфическую активность. На модели белых лабораторных мышей была оценена протективная активность конъюгатов холерных антигенов с наночастицами при заражении вакцинированных животных с применением в качестве контроля коммерческой вакцины. Показано, что по иммуногенности созданные прототипы холерной вакцины с использованием в качестве носителя и адъюванта наночастиц золота соответствовали регламенту производства на национальную российскую холерную химическую вакцину.

Ключевые слова: наночастицы золота, *Vibrio cholerae*, иммунизация, вакцинация

DOI: 10.31857/S2686738920010084

В последние десятилетия наночастицы золота (НЧЗ) нашли многочисленные применения в различных областях биомедицины [1, 2], однако работ, посвященных иммунологическим свойствам НЧЗ, не так много. Благодаря внедрению в медицину методов и достижений нанотехнологий в последние годы вырос интерес к наноносителям антигенов (Аг). При их применении меняются формы проявления иммуногенности заданного вещества в иммунной системе организма-хозяина. Подобные наночастицы могут выступать и в роли носителя Аг и в качестве адъюванта [3, 4].

В 1986 г. появились сведения об успешной попытке получения антител (Ат) к глютаминовой кислоте с использованием в качестве носителя частиц коллоидного золота [5]. После этого вышел ряд работ, авторы которых применяли и развивали предложенный метод для получения Ат к некоторым гаптенам и полноценным Аг. В результате получали антисыворотки с высоким тит-

ром, которые не требовали дальнейшей очистки от балластных Ат. В 1996 г. была опубликована статья [6], в которой авторы впервые показали возможность использования частиц коллоидного золота в составе антивирусной вакцины как носителей белкового Аг капсида вируса клещевого энцефалита. Несмотря на то, что в состав вакцины не входили адъюванты, предложенная экспериментальная вакцина обладала более высокими протективными свойствами по сравнению с коммерческими аналогами.

Настоящий всплеск активности в области иммунологического применения НЧЗ можно наблюдать последние три–четыре года [7, 8], когда НЧЗ начали использовать для создания экспериментальных пептидных и углеводных вакцин против вирусных и бактериальных инфекций, для разработки вакцин против заболеваний, вызываемых простейшими [8]. Кроме традиционных антибактериальных и антивирусных вакцин конъюгаты опухолевых Аг с НЧЗ предложено применять для создания антираковых вакцин и иммунотерапии рака [9].

В связи с эпидемической ситуацией по холере в России и в мире необходима специфическая профилактика этого заболевания [10, 11]. В 2001 г. в России вакцинация против холеры была включена в календарь профилактических прививок по

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской Академии наук, Саратов, Россия

² Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб” Роспотребнадзора, Саратов, Россия

*e-mail: dykman_l@ibppm.ru

Таблица 1. Показатели специфической активности сывороток к Ag холерного вибриона, конъюгированным с НЧЗ

| Наименование сыворотки | Специфическая активность (титр) | | |
|------------------------|---------------------------------|----------|---------|
| | РДП | РА | ДИА |
| Сыворотка к Ag3 | 1 : 16 | 1 : 3200 | 1 : 500 |
| Сыворотка к Ag4 | 1 : 16 | 1 : 6400 | 1 : 80 |
| Сыворотка к Ag5 | 1 : 16 | 1 : 1600 | 1 : 40 |
| Сыворотка к Ag6 | 1 : 8 | 1 : 1600 | 1 : 640 |
| Сыворотка к Ag7 | 1 : 16 | 1 : 3200 | 1 : 500 |

эпидемическим показанием. Поэтому разработка и усовершенствование современных вакцин против холеры является важным и перспективным направлением научных исследований. *Vibrio cholerae* имеет очень сложный антигенный состав, что препятствует созданию эффективных универсальных вакцин против большого разнообразия штаммов, биоваров и серогрупп холерного вибриона [12].

Основной целью работы являлось получение конъюгатов НЧЗ с Ag холерного вибриона и оценка эффективности иммунизации и вакцинации предложенными конъюгатами.

Наночастицы золота со средним диаметром частиц 15 нм получали по методу Frens [13], используя реакцию восстановления HAuCl_4 цитратом натрия. Средний диаметр полученных наночастиц составил 15.2 нм. По нашим данным, использование для иммунизации НЧЗ сферической формы со средним диаметром 15 нм является оптимальным [14].

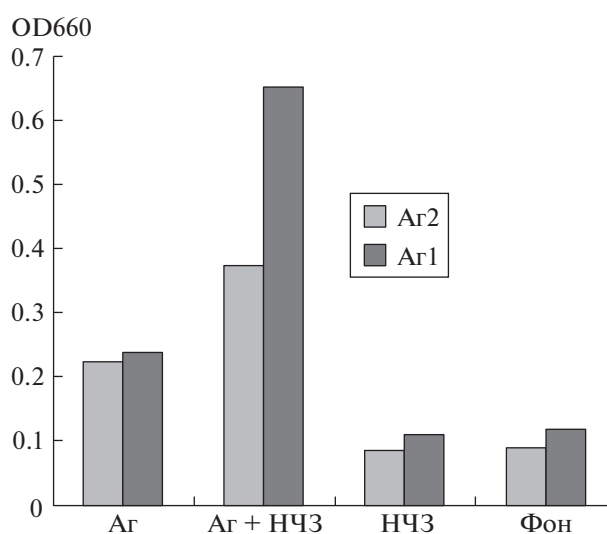


Рис. 1. Уровень антитоксических антител у белых мышей, иммунизированных протективными антигенами Ag1 и Ag2 холерного вибриона.

Были синтезированы конъюгаты НЧЗ с семью Ag холерного вибриона: холероген-анатоксином штамма 569В Инаба (Ag1), O-Ag штамма M41 Огава (Ag2), O-Ag штамма 569В Инаба (Ag3), O-Ag штамма KM262 биовара Эль Тор серовара Огава (Ag4), O-Ag штамма KM263 биовара Эль Тор серогруппы (Ag6), холерным токсином штамма 569В Инаба (Ag7). Конъюгацию проводили простым смешением реагентов без использования сшивающих агентов.

Для получения иммунных сывороток использовали кроликов породы шиншилла весом 2–2.5 кг. В качестве иммуногенов применяли Ag3, Ag4, Ag5, Ag6 и Ag7. Для получения антисывороток был выбран подкожный метод введения материала с полным адъювантом Фрейнда. Был проведен цикл иммунизаций по пять подкожных инъекций в дозах от 1 до 4 мл с интервалом в 4 сут. Через 10 сут после дополнительной однократной иммунизации внутривенным введением 2 мг Ag проводили забор крови. Специфическую активность (титр) антисывороток определяли в реакции агглютинации (РА) пробирочным методом с соответствующими штаммами *V. cholerae*, в реакции диффузной преципитации (РДП) и в дот-иммуноанализе (ДИА) с гомологичными Ag. Токсин-нейтрализующие антитела сыворотки к холерному токсину определяются методом кожной пробы Крейга на кроликах по минимальному количеству сыворотки, нейтрализующей токсин, выраженному в активных единицах (АЕ). Иммуноферментный анализ (ИФА) для определения антител в сыворотке крови лабораторных животных проводили по общепринятой схеме, в качестве сенситинов использовались гомологичные антигены, в качестве маркёров — антивидовые антитела, меченные пероксидазой хрена.

Нами были получены пять серий кроличьих гипериммунных сывороток к холерным O-Ag, конъюгированным с НЧЗ. Усредненные показатели специфической активности полученных сывороток приведены в табл. 1. Как видно из таблицы, активность сывороток, полученных на экспериментальные Ag, была достаточно высокой по условиям нормативных требований.

Активность токсин-нейтрализующих антител сыворотки к Ag7 составила 3200 АЕ по сравнению с 1600 АЕ при иммунизации неконъюгированным Ag7.

При иммунизации белых мышей препаратами Ag1 и Ag2 в дозе 10 мкг было установлено, что по результатам ИФА на 21-е сутки титр специфических антител к Ag1 и Ag2 для конъюгированных антигенов был значительно выше. Усредненные результаты по пулу из 10 мышей, измеренные в трёх повторностях, представлены на рис. 1.

На модели белых лабораторных мышей была оценена протективная активность конъюгатов холерных Аг с НЧЗ при заражении вакцинированных мышей штаммом *V. cholerae* M879. Экспериментальная вакцина серии 012 состояла из смеси Аг1 (35 мг) и Аг3 (10 мг), конъюгированных с НЧЗ. В качестве контроля использовали коммерческую вакцину, серия 8 (РосНИПЧИ “Микроб”).

Иммунизацию мышей дозами по 0.5 мл, соответствующими 1 : 1000; 1 : 5000; 1 : 25000; 1 : 125000 части готовой формы вакцины, по восемь животных для каждой дозы проводили внутрибрюшинно. Значения эффективной дозы (ED₅₀) холерной вакцины и летальной дозы (LD₅₀) заражающего штамма определяли по методу Кербера в модификации Ашмарина [15]. Заражение иммунизированных мышей осуществляли штаммом *V. cholerae* M879 в дозе 350 LD₅₀ спустя две недели после иммунизации. Мышей контролировали на протяжении 72 ч, учитывая количество павших, и определяли LD₅₀ заражающего штамма. Заражение проводили внутрибрюшинно, используя клетки штамма *V. cholerae* M879 после их роста в течение (4 ± 1) ч на плотной питательной среде и разведенные до концентрации 6, 12, 24, 48 и 96 м.к. в 1 мл. Для контроля проводили заражение 10 неиммунизированных мышей этим же штаммом холерного вибриона.

Результаты исследований протективного эффекта конъюгатов Аг холерного вибриона с НЧЗ приведены в табл. 2. Данные таблицы свидетельствуют о том, что по иммуногенности прототип холерной химической вакцины (серия 012) соответствовал требованиям на вакцину, так как ED₅₀ была не более 1/20000 части готовой формы вакцины.

Таким образом, были синтезированы конъюгаты НЧЗ с семью Аг холерного вибриона. Проведена иммунизация животных полученными конъюгатами, получены кроличьи поликлональные Аг к исследуемым Аг и иммунохимическими методами определены их титры, чувствительность и специфичность по отношению к растворимым иммуногенам и целым клеткам *V. cholerae*. Полученные антисыворотки показали высокую специфическую активность. На модели белых лабораторных мышей была оценена протективная активность конъюгатов холерных Аг с НЧЗ при заражении вакцинированных мышей штаммом *V. cholerae* M879 с применением в качестве контроля коммерческой вакцины. Приведенные данные свидетельствуют о том, что по иммуногенности созданные прототипы холерной химической вакцины с использованием в качестве носителя и адьюванта НЧЗ соответствовали регламенту производства на национальную российскую холерную химическую вакцину.

Таблица 2. Выживаемость животных после вакцинации и заражения 350 LD₅₀ штамма *V. cholerae* Eltor M879

| № серии, штамм | Доза вакцинации | Пало после заражения | ED ₅₀ |
|--|----------------------|----------------------|------------------|
| 8 | 1/1000 | 2 | 1/102333 |
| | 1/5000 | 0 | |
| | 1/25000 | 1 | |
| | 1/125000 | 2 | |
| 012 | 1/1000 | 0 | 1/102333 |
| | 1/5000 | 1 | |
| | 1/25000 | 0 | |
| | 1/125000 | 4 | |
| <i>V. cholerae</i> Eltor M879 (контроль) | 350 LD ₅₀ | 10 | |

Отметим преимущества использования НЧЗ в качестве средств доставки вакцин: их относительно небольшой размер, который позволяет легко проникать в ткани, малая токсичность и длительная циркуляции *in vivo*, низкая стоимость, воспроизводимость. Вакцинация несколькими консервативными Аг, конъюгированными с НЧЗ, имеет преимущества перед использованием отдельных Аг. Кроме того, НЧЗ могут быть обнаружены с использованием неинвазивных методов визуализации, предоставляя информацию о том, были ли доставлены вакцины, что помогает прогнозировать или оценивать эффективность. Система доставки на основе НЧЗ может защитить вакцины от преждевременной деградациии, улучшить стабильность, обладает хорошими адьювантными свойствами, а также способствует целевой доставке иммуногена антигенпрезентирующим клеткам.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

При работе с животными авторы руководствовались Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Все участники, внесшие существенный вклад в исследование, представлены как соавторы.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-14-00077 (Л.А.Д.), а также в рамках темы НИР АААА-А17-117102740097-1 (С.Ю.Щ.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dreaden E.C., Alkilany A.M., Huang X., Murphy C.J., El-Sayed M.A. // Chem. Soc. Rev. 2012. V. 41. P. 2740–2779.
2. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Gold Nanoparticles in Biomedical Applications. Boca Raton: CRC Press. 2017. 332 p.
3. Lin L.C.-W., Chattopadhyay S., Lin J.-C., Hu C.-M.J. // Adv. Healthc. Mater. 2018. V. 7. e1701395.
4. Kelly H.G., Kent S.J., Wheatley A.K. // Expert Rev. Vaccines. 2019. V. 18. P. 269–280.
5. Shiosaka S., Kiyama H., Wanaka A., Tohyama M. // Brain Research. 1986. V. 382. P. 399–403.
6. Демнев В.А., Щинова М.А., Иванов Л.И., Воробьева Р.Н., Здановская Н.И., Небайкина Н.В. // Вопр. вирусол. 1996. Т. 41. С. 107–110.
7. Carabineiro S.A.C. // Molecules. 2017. V. 22. e857.
8. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. // Chem. Sci. 2017. V. 8. P. 1719–1735.
9. Evans E.R., Bugga P., Asthana V., Drezek R. // Mater. Today. 2018. V. 21. P. 673–685.
10. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Шуковская Т.Н., Смирнова Н.И., Никифоров А.К., Еремин С.А., Топорков В.П. // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. № 107. С. 5–12.
11. Harris J.B. // J. Infect. Dis. 2018. V. 218. P. S141–S146.
12. Никифоров А.К., Комиссаров А.В., Ульянов А.Ю., Еремин С.А., Волох О.А., Белякова Н.И., Алешина Ю.А., Васин Ю.Г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2012. № 112. С. 85–88.
13. Frens G. // Nature Phys. Sci. 1973. V. 241. P. 20–22.
14. Dykman L.A., Staroverov S.A., Fomin A.S., Khanadeev V.A., Khlebtsov B.N., Bogatyrev V.A. // Int. Immunopharmacol. 2018. V. 54. P. 163–168.
15. Воробьев А.А., Кривошеин Ю.С., Ширококов В.П. Медицинская и санитарная микробиология. М.: Академия. 2003. 464 с.

OBTAINING AND CHARACTERISTIC OF ANTIBODIES TO VIBRIO CHOLERAE PROTECTIVE ANTIGENS CONJUGATED WITH GOLD NANOPARTICLES

L. A. Dykman^{a, #}, O. A. Volokh^b, O. V. Gromova^b, O. S. Durakova^b, S. A. Vorobeva^b, M. N. Kireev^b, L. F. Livanova^b, A. K. Nikiforov^b, S. Y. Shchyogolev^a, and Academician of the RAS V. V. Kutyrrev^b

^a Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russian Federation

^b Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Saratov, Russian Federation

[#]e-mail: dykman_l@ibppm.ru

Gold nanoparticle conjugates with *Vibrio cholerae* antigens were synthesized. The animals were immunized with the obtained conjugates. Rabbit polyclonal antibodies to the antigens were obtained, which showed high specific activity. On the model of white laboratory mice, the protective activity of conjugates of cholera antigens with nanoparticles during infection of vaccinated animals was evaluated using a commercial vaccine as a control. It was shown that in terms of immunogenicity, the created prototypes of cholera vaccine using gold nanoparticles as a carrier and adjuvant complied with the production regulations for the Russian national cholera chemical vaccine.

Keywords: gold nanoparticles, *Vibrio cholerae*, immunization, vaccination