

## **РАЗРАБОТКА ВАКЦИН НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ СТРУКТУРНОГО ОБЪЕДИНЕНИЯ АНТИГЕНОВ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРНЫХ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ**

Р.М. ХАИТОВ

Государственный научный центр - Институт иммунологии Минздрава России

Предложен и экспериментально доказан иммуногенетический принцип создания искусственных антигенов и вакцин, обладающих повышенной иммуногенностью и способных индуцировать высокий иммунный ответ у генетически слабо реагирующих особей. На основе этого принципа разработаны вакцины нового поколения против возбудителей гриппа, сальмонеллеза; теоретически обоснованы и разработаны способы получения аллерговакцин для терапии аллергических заболеваний.

**Ключевые слова:** вакцина, антиген, синтетические полимерные иммуномодуляторы

Проблема искусственных вакцин чаще всего воспринимается и трактуется подобно проблемам искусственных гормонов, витаминов, антибиотиков, которые складываются из трех основных звеньев: выделение биологически активного соединения, расшифровка его молекулярной структуры и искусственный синтез (ресинтез). Третье звено осуществляется или чисто химическими методами, или генно-инженерными. В последнем случае синтезируется кодирующая данный белок ДНК, которая вводится в бактериальные или эукариотические клетки для накопления продукта с помощью биотехнологических процессов.

Такая постановка проблемы справедлива только в отношении искусственных антигенов, но не искусственных вакцин, поскольку антиген - это индивидуальное биоорганическое соединение, а вакцина - препарат обеспечивающий развитие иммунитета, невосприимчивости к возбудителю. Создание искусственного инсулина, или бактериального полисахарида, типичного для бактерий кишечной группы, - это одновременно создание искусственного антигена, ибо любой белок или полисахарид представляет собой антиген. Но искусственный антиген не есть искусственная вакцина, так как возникновение иммунитета представляет собой функцию иммунной системы организма, реагирующего на введение антигена, а не функцию самого антигена. Последнее было осмыслено по-настоящему сравнительно недавно [17,24]. Стало ясно, что на один и тот же антиген индивидуумы одного генотипа реагируют развитием высокого иммунного ответа, в то время как другие индивидуумы развивают слабую реакцию или не реагируют совсем. И, наоборот, один и тот же индивидуум сильно реагирует на один антиген и не реагирует на другие. Проблема искусственных антигенов в значительной степени решена современной биоорганической химией, поскольку любое искусственно синтезированное биоорганическое соединение суть искусственный антиген.

При создании искусственных вакцин стоит особая задача - не просто ресинтезировать определенный антиген или антигенную детерминанту (ответственный за иммунный ответ участок макромолекулы), а искусственно создать препарат, который бы обеспечил развитие иммунитета даже в том случае, когда против данного антигена иммунитета не возникает. Поясним это положение следующими примерами. У человека, переболевшего воспалением легких, малярией, гриппом и некоторыми другими инфекциями,

не возникает иммунитета к повторному заражению возбудителями данных инфекций, хотя возбудители перечисленных заболеваний несут соответствующие чужеродные человеку антигенные субстанции. А это значит, что выделение этих субстанций, расшифровка их строения, ресинтез и использование для вакцинации не приведут к успеху, поскольку организм не в состоянии развить иммунитет даже при заражении самим возбудителем. При создании искусственных вакцин необходимо получить такой искусственный биоорганический комплекс, который бы обеспечивал иммунный ответ организма на данный антиген вопреки его генетически predetermined низкой отвечаемости. Только в этом случае искусственные вакцины окажутся существенным шагом вперед по сравнению с естественными, представляющими собой препараты из ослабленных или убитых возбудителей инфекционных болезней или препараты, выделенных из них антигенных субстанций. Конечно, копирование определенных антигенов и антигенных детерминант — это важнейшее дело современной молекулярной биологии и биотехнологии, но на пути простого копирования нет принципиально новых подходов к решению проблемы еще не побежденных инфекций человека и животных, поскольку, если иммунитет не возникает против реальных антигенов, он не возникает и против их искусственных копий. Таким образом, искусственное копирование антигенов или ответственных антигенных детерминант в лучшем случае приведет к созданию вакцин без балласта, то есть без ненужных примесей, но не решит проблемы непобежденных инфекций.

Большинство применяемых в повседневной практике вакцин содержит, помимо антигенных детерминант, значительное количество балластных веществ, в том числе высокотоксичных примесей, вызывающих нежелательные побочные реакции.

В ряде случаев достигнут большой прогресс в очистке антигенов. Помимо очистки из вируса или бактерии необходимо выделить ответственную за иммунизацию молекулу — антиген. Но и в этом антигене ответственной за создание иммунитета является лишь определенная, в большинстве случаев еще неизвестная часть — антигенная детерминанта. Задача состоит в том, чтобы выявить антигенную молекулу, расшифровать ее структуру, определить ответственную за иммунизацию часть и научиться синтезировать эту молекулу или ее часть. Идеальной иммунизирующей компонентой являлась бы эта часть — без загрязнений, без балласта, без токсичных примесей.

Следует сказать, что фармакология уже отходит от создания лекарств, химическая структура которых не расшифрована. В некоторых странах новое лекарство утверждается только тогда, когда известна его химическая формула. Такой же подход должен быть реализован в будущем относительно вакцин.

Проблема искусственных вакцин весьма актуальна даже применительно к побежденным инфекциям — оспе, полиомиелиту, кори и некоторым другим. Под словом "побежденные" имеются в виду те, против которых уже созданы высокоэффективные вакцины. Конечно, эти вакцины токсичны, загрязнены примесями, но они есть. В этом отношении проблема искусственных вакцин — это проблема повышения их безвредности.

Особенно важна проблема искусственных вакцин в области создания эффективных препаратов против еще не побежденных инфекций. Среди них могут быть названы паразитарные инфекции (в том числе малярия), ряд вирусных заболеваний, включая гепатит, грипп, африканскую чуму свиней и другие инфекции сельскохозяйственных животных, а также чума и венерические болезни.

Особенность антигенов большинства возбудителей непобежденных инфекций состоит в том, что они относятся к категории так называемых слабых антигенов, то есть против них не развивается выраженный иммунный ответ. Иммунитет не возникает не только

после вакцинации выделенными антигенами, но и после иммунизации живым ослабленным возбудителем. Даже перенесенная болезнь не оставляет стойкого и длительного иммунитета. Иначе говоря, иммунизируемый организм в отношении ряда антигенов не в состоянии развить быструю и высокую иммунную реакцию.

В последнее десятилетие открыты механизмы генетического контроля силы иммунного реагирования, гены иммунного ответа, так называемые Ig-гены. Это открытие отмечено в 1980 г. Нобелевской премией. Имеются Ig-гены высокого ответа к определенным антигенам и Ig-гены низкого ответа к данным антигенам. Если индивидуум или большая часть популяции содержит Ig-ген низкого ответа к главным антигенам, например, вируса гриппа, то создать у такого индивидуума или популяции высокий иммунный ответ известным со времени Пастера способом невозможно. Нужны новые принципы, которые предусматривали бы нахождение путей стимуляции иммунитета, вопреки генетически детерминированной низкой реагируемости. Иначе говоря, речь идет о создании способов фенотипической коррекции генного контроля иммунитета, то есть способов превращения генетически низкореагирующих на конкретный антиген особей в высокореагирующие.

Создание искусственных вакцин особого типа с включением в них стимулирующего компонента открывает такую возможность. Для осуществления фенотипической коррекции нами разрабатываются комплексные антигены – такие искусственные макромолекулярные комплексы, в состав которых входят и необходимые антигенные детерминанты, и стимулирующая (адьювантная) структура, обеспечивающая фенотипическую коррекцию [18,20,26,34].

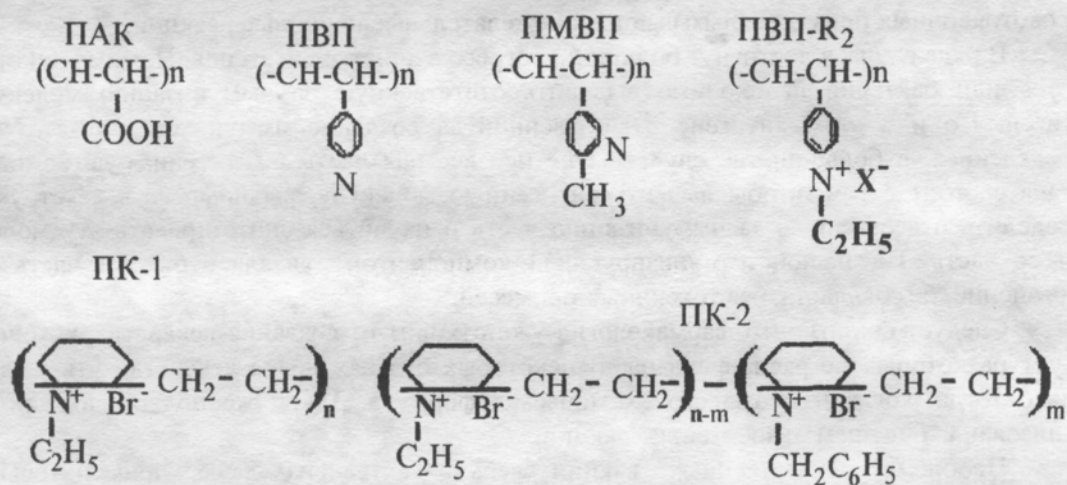


Рис 1 Синтетические неприродные карбоцепные и гетероцепные полиэлектролиты с контролируемой структурой.

Суть этого нового принципа заключается в следующем. Ig-Гены действуют через Т-систему лимфоцитов. Поэтому поиск и создание иммунопотенцирующих компонентов для антигенов, превращающих их в Т-независимые, – фактически путь к обеспечению Ig-независимого иммунного ответа, то есть к превращению низкоотвечающих особей в высокоотвечающие.

Необходимыми для этого свойствами обладают некоторые синтетические неприродные карбоцепные и гетероцепные полиэлектролиты с контролируемой структурой. К ним относятся полиакриловая кислота (ПАК), поли-4-винилпиридин (ПВП), поли-2-метил-



5-винилпиридин (ПМВП), поли-4-винил-N-этилпиридиний бромид (ПВП-R2), бетаиновые производные гетероцепных алифатических полимерных окисей (ПК-1, ПК-2) (Рис. 1).

Относительная простота синтеза и строения этих полимеров, возможность получения полимерных цепей в широком диапазоне молекулярных масс, растворимость в воде, а также способность некоторых из них к биодеструкции и выведению из организма открывают широкие перспективы использования в целях иммуностимуляции этих соединений.

В 1974 г. мы показали [16], что введение поликатиона ПВП мышам и крысам, иммунизированным эритроцитами барана (ЭБ), вызывает повышение иммунного ответа в 5-10 раз. Эффект стимуляции антителогенеза прямо зависит от степени полимеризации и дозы ПВП. При введении мышам полиионов, таких как ПАК, сульфат декстрана и ряд других полианионных производных декстрана, также наблюдается прямая зависимость между повышением антителогенеза, степенью полимеризации и дозой полимеров. Следует подчеркнуть, что мономерные аналоги звеньев указанных полимеров совершенно не проявляют адъювантного свойства. Сополимеры акриловой кислоты и N-винилпирролидона обладают необходимыми физико-химическими и иммунопотенцирующими свойствами, что явились стимулом для интенсивного изучения полианионов этого ряда. Показано, что эти сополимеры усиливают иммунный ответ к растворимым и корпускулярным антигенам у мышей, крыс, кроликов, собак, стимулируют клеточно-опосредованный иммунный ответ и иммунологическую память.

При изучении механизмов действия синтетических полиэлектролитов на иммуногенез было установлено [13,14,15,23,36,37,39], что карбоцепные полиэлектролиты - ПВП, ПАК, сополимеры акриловой кислоты и N-винилпирролидона, сополимеры N-винилфталимида и N-винилпирролидона, сополимеры N-виниламина и N-винилпирролидона, а также ряд гетероцепных полиэлектролитов, представляющих собой бетаиновые производные алифатических полимерных N-окисей, стимулируют пролиферацию и миграцию кроветворных стволовых клеток, расселение Т-лимфоцитов из тимуса и В-лимфоцитов из костного мозга в периферические лимфоидные органы. Введение синтетических полиэлектролитов в систему взаимодействующих Т- и В-лимфоцитов и ЭБ вызывает существенное повышение выхода формирующихся антителопродуцентов.

В экспериментах, проведенных на модели с введением сингенным реципиентам только В-клеток в смеси с ЭБ, не индуцировало иммунного ответа. Введение смеси Т- и В-клеток приводило к образованию большого числа антителообразующих клеток (АОК). Действие полиионов анализировали в Т- и В-системе с минимальным уровнем Т-клеток и избытком В-клеток методом лимитирующих разведений. В этом случае полиионы (ПВП и ПАК) оказывали такое же действие, как и дополнительно введенные Т-хелперы. Иначе говоря, введение полиионов в систему взаимодействующих в иммунном ответе Т- и В-клеток приводило к резкому повышению продукции АОК, сравнимому с эффектом стимуляции накопления АОК при дополнительном введении Т-клеток. Таким образом, синтетические полиэлектролиты интенсифицируют процесс кооперции Т- и В-клеток при иммунном ответе к Т-зависимому антигену. В этих же исследованиях было обнаружено, что полиэлектролиты способны индуцировать трансформацию В-клеток, иммунизированных ЭБ, в АОК без участия хелперных Т-лимфоцитов. В этой связи были проведены эксперименты на В-мышях и мышях пу/пу, которые практически не содержат Т-клеток. Оказалось, что введение Т-дефицитным животным синтетических поликатионов или полианионов вызывает развитие выраженного иммунного ответа к Т-зависимому антигену, причем наблюдали усиление не только первичного, но и вторичного иммунного ответа с образованием IgM- и



IgG-АОК. Эти данные свидетельствуют, что синтетические полиэлектролиты способны в определенной степени замещать функцию Т-хелперов [11,32,33].

Как полимеры активируют иммунокомпетентную клетку? Поиск триггерного механизма на уровне мембраны привел нас к обнаружению наиболее сильных и быстрых изменений в мембранной системе ионного транспорта [2,3,4,26,27,40]. После воздействия полимером на клетку уже через несколько десятков секунд видно значительное повышение проницаемости плазматической мембраны для ионов  $K^+$  и  $Ca^{2+}$ . Зарегистрировано увеличение потоков этих катионов по градиенту их концентрации, а именно,  $K^+$  – из клетки, а  $Ca^{2+}$  – в клетку. Этот эффект не является следствием угнетения работы  $(Na^+, K^+)$ -АТФазы. Более того, ионотранспортирующие АТФазы активируются после воздействия полимерным стимулятором на клетку.

Некоторые факты позволяют считать, что способность полимера повышать проницаемость мембраны для ионов есть главное свойство, определяющее его иммуностимулирующую активность. Во-первых, только полимеры, способные увеличивать проницаемость клеточной мембраны, активируют деление и антигензависимую дифференцировку лимфоцитов. Во-вторых, известные ранее стимуляторы лимфоцитов (митогены) приводят к сходному повышению проницаемости мембраны для ионов. Наконец, в-третьих, искусственное повышение проницаемости мембраны с помощью мембраноактивных эффекторов или ионофоров приводит к значительной активации деления и антигензависимой дифференцировки лимфоцитов. Каков механизм повышения электропроводности мембраны?

Главное значение имеет кооперативное взаимодействие полиэлектролита с белками мембраны, а не с липидным матриксом. Наиболее правдоподобная гипотеза связывает повышение ионной проницаемости со способностью полимера вызывать агрегацию белков в клеточной мембране. Например, полиионы способны комплексоваться с белками и повышать проницаемость клеточной мембраны. Нейтральные полимеры не обладают комплексообразующей активностью и не повышают проницаемости клеточной мембраны. Укорочение полиионных цепей до размеров, соизмеримых с поперечником белковых глобул, приводит к потере полимером способности перекрестно сшивать (агрегировать) белки как в растворе, так, по-видимому, и в мембране. Короткие полимерные цепи (порядка  $10-50 \text{ \AA}$ ) не могут вызывать агрегацию белков и повышать проницаемость клеточной мембраны для ионов. Приведенные экспериментальные факты скорее всего свидетельствуют о необходимости агрегации белков мембраны для повышения ее проницаемости. Наконец, недавно нам удалось визуализировать предполагаемые белковые агрегаты в клеточной мембране, образующиеся после воздействия полиионом. Методами электронной микроскопии показано, что полиионы, повышающие проницаемость плазматической мембраны для калия и кальция, индуцируют микроагрегацию белков мембраны. При этом в клеточной мембране образуются кластеры, состоящие в среднем из 20-50 белковых глобул.

Выше упоминалось, что генетические различия в высоте иммунного ответа у животных разных генотипов преимущественно реализуются на уровне Т-клеток. Было установлено, что меньшее накопление АОК в селезенке низкоотвечающих генотипов мышей по сравнению с высокоотвечающими в значительной степени обусловлено слабо выраженными процессами миграции и кооперации Т- и В-лимфоцитов при иммунизации конкретным антигеном. Следовательно, были основания предположить, что усиление иммунного ответа у низкоотвечающих генотипов животных возможно путем введения им полиионов, стимулирующих эти процессы. Это предположение полностью подтвердилось.

Введение мышам синтетических полиионов обеспечивает фенотипическую коррекцию генного контроля иммунного ответа на разнообразные антигены: иммунный ответ низкореагирующих на конкретный выбранный антиген линий мышей под влиянием поликатиона или полианиона повышается до уровня животных, высокореагирующих на этот антиген линий. Показана фенотипическая коррекция под влиянием ПАК и ПВП иммунного ответа на синтетический полипептид (Т, Г) – А – Л, контролируемого Ir-IA-геном [30].

При изучении химической структуры исследованных полиэлектролитов был сделан вывод о том, что в основе их иммуностимулирующей активности лежат механизмы, обусловленные в первую очередь их макромолекулярными свойствами. Одно из таких свойств макромолекул – способность к многоточечному кооперативному взаимодействию с другими комплементарными молекулами с образованием устойчивых интерполимерных комплексов или к прочной адсорбции на химически комплементарных поверхностях [7,8,9,10,11,12]. Поверхность же лимфоцитов, образованная внешними мембранами, представляет собой универсальный многоточечный гетерофункциональный сорбент для полиэлектролитов и некоторых других гидрофильных полимеров. Очевидно, что именно сорбцией полиэлектролитов на клеточной мембране объясняется их способность прямо активировать лимфоциты.

Из данных, полученных в модельных экспериментах *in vivo* и *in vitro*, следует, что введенный в кровь линейный полиэлектролит в первую очередь вступает во взаимодействие с белками и с форменными элементами крови, склеивая их между собой в самых различных комбинациях. Вместе с тем специфические реакции перекомплексирования позволяют каждой макромолекуле в поисках локального термодинамического оптимума многократно менять партнеров по взаимодействию. Иначе говоря, введенный в организм полиэлектролит за время своего активного взаимодействия с компонентами крови и лимфоидной системы способствует установлению огромного множества более или менее продолжительных межклеточных, межмолекулярных и внутримолекулярных контактов. Совместное введение полиэлектролита и антигена сопровождается усилением антигенспецифического иммунного ответа. Очевидно, это происходит по двум причинам. Во-первых, антиген индуцирует клональную экспансию специфических лимфоцитов, и вероятность встречи антигенспецифических лимфоцитов с полиэлектролитом существенно возрастает. Во-вторых, неспецифический полимерный адъювант в ходе случайных перестроек в конечном счете может способствовать самосборке высокоспецифичных комплексов антиген – полиэлектролит – лимфоцит. Если это так, то максимальная стимуляция специфического иммунного ответа должна происходить при иммунизации заведомо приготовленными конъюгатами антигена и полиэлектролита. В этом случае антиген должен фокусировать действие полиэлектролита на соответствующем клоне лимфоцитов, а полиэлектролит, взаимодействуя с клеточной мембраной, – обеспечить стимуляцию лимфоидной клетки.

Такая "комбинированная" молекула должна идеально сочетать в себе как антигенную специфичность, так и иммуностимулирующие свойства, даже при наличии F<sub>γ</sub>-генов низкого ответа.

В ранних работах [29,33] исследовали антигенные свойства комплексов, у которых гаптен связан с поликатионами ПВП и ПМВП. В качестве носителя был выбран ПМВП со степенью полимеризации 10<sup>2</sup> и тринитрофенолат (ТНФ) в качестве гаптена.

Эти два компонента в растворе образуют относительно сильный солевой комплекс, стабилизируемый частичным переносом заряда от мономерного звена (донора электронов) на анион ТНФ, служащий акцептором электронов. Реактивы смешивались таким образом, что на каждые 100 единиц ПВП в среднем приходилось 18 единиц, несущих анионы ТНФ.

Полученным таким образом препаратом иммунизировали intactных мышей. Было показано, что конъюгаты ТНФ и ПМВП вызывают достаточно сильный иммунный ответ, сопровождающийся, как и следует ожидать, образованием ТНФ-специфических АОК. Раздельное введение гаптена и носителя не давало такого эффекта. Далее, в экспериментах с В-мышами, аналогичных описанным выше, было показано, что искусственный антиген ТНФ-ПМВП, действительно является тимуснезависимым.

Затем исследовали комплексы, полученные присоединением к полимерным носителям слабоиммуногенного белкового антигена – бычьего сывороточного альбумина (БСА), вызывающего IqG-иммунный ответ только после многократной иммунизации животных при условии дополнительной стимуляции адъювантами типа Фрейнда. Оказалось, что присоединение БСА к молекулам полииона обеспечивает индукцию повышенного иммунного ответа к белковой детерминанте этого искусственного антигена. Искусственные антигены готовили либо в виде комплекса БСА с поликатионом, либо в виде ковалентно связанного с поликатионом БСА. Кроме того, изучали иммуногенные свойства искусственного антигена, полученного комплексированием относительно высокоиммунного белка – бычьего гамма-глобулина с поликатионом. Проведенные исследования показали, что при комбинировании всех использованных белковых антигенов с полимерными адъювантами действительно получаются очень сильные искусственные антигены, вызывающие синтез антител IqM и IqG изотипов, специфических по отношению к белковой составляющей конъюгата. Сила иммунного ответа при иммунизации комплексными искусственными антигенами в 50-100 раз превышает иммунный ответ на введение исходного антигена без полимера. Все эти искусственные антигены при введении генетически бестимусным мышам вызывали выраженный иммунный ответ, то есть обладали свойствами Т-независимых антигенов, которые могут открыть путь к осуществлению фенотипической коррекции иммунного ответа [21].

Для проверки этого предположения были синтезированы полностью искусственные антигены, представляющие собой комплексы синтетического полипептида (Т,Г)-А-Л с полиэлектролитами. (Т,Г)-А-Л, представляющий собой синтетический сополимер тирозина, глутаминовой кислоты, аланина и лизина, как известно, вызывает иммунный ответ узкой специфичности, контролируемый Fr-1A-геном. Синтезированные конъюгаты (Т,Г)-А-Л с ПАК и сополимером акриловой кислоты и N-винилпирролидоном и другими полиионами содержали 90-100 мкг полипептида на 1 мг конъюгата. Для индукции первичного антительного ответа на (Т,Г)-А-Л мышей линий СВА и С57В1 внутрибрюшинно иммунизировали растворами чистого (Т,Г)-А-Л или конъюгатов (Т,Г)-А-Л с ПАК и рядом других полиионов. Для оценки вторичного иммунного ответа иммунизированным животным через один месяц внутрибрюшинно вводили раствор чистого (Т,Г)-А-Л. Конъюгат синтетического полипептида (Т,Г)-А-Л с полианионом ПАК вызывал высокий иммунный ответ у мышей генетически низкореагирующей линии [31].

Итак, полностью искусственный антиген, представляющий собой конъюгат (Т,Г)-А-Л с синтетическими полиэлектролитами, проявляет свойства сильного иммуногена, индуцирующего выраженный Ir-1A- независимый иммунный ответ, что обеспечивает превращение генетически низкореагирующих к (Т,Г)-А-Л особей в фенотипически высокореагирующие.

Искусственные конъюгаты (Т,Г)-А-Л-полиэлектролит усиливают как первичный, так и вторичный иммунный ответ. В данном случае очень важна коррекция вторичного иммунного ответа, так как действие Ir-1A гена проявляется при реализации иммунологической памяти после повторного введения (Т,Г)-А-Л. Известно, что в механизме



приобретения, хранения и реализации иммунологической памяти участвуют и Т- и В-лимфоциты. Так, В-мыши не способны к развитию иммунологической памяти к Т-зависимым антигенам. У "восстановленных" Т-клетками В-мышей индуцируется иммунологическая память, хранителями которой являются и В- и Т-лимфоциты. Генетический дефект Ig-IA-гена проявляется на уровне Т-хелперов, кооперирующихся с В-клетками при Т-зависимом иммунном ответе. Синтетические полиэлектролиты обеспечивают Т-независимость иммунного ответа к Т-зависимым антигенам, очевидно, путем замещения неспецифического сигнала Т-клеток-хелперов. Отсюда следует, что фенотипическая коррекция Ig-генного контроля, которая наблюдается при иммунизации искусственным антигеном (Т,Г)-А-Л-полиэлектролит, может быть результатом модификации антигена полиэлектролитом, придающим ему свойства Т-независимого антигена.

Были изучены иммуногенные свойства конъюгатов, полученных путем конденсации Х-терминального фрагмента цепи гемагглютинаина  $\text{HA}_2$  вируса гриппа А (F/A пептид) с синтетическими полиионами различной структуры. Додекапептид синтезировался методами классической химии пептидов с использованием постепенного наращивания цепи и конденсации фрагментов блока. Пептид присоединялся к N- и C терминальным группам. С помощью различных иммуноферментных систем тестирования изучался иммунный ответ у мышей, вакцинированных этими полностью синтетическими антигенами, на гомологичный антиген F/A и гемагглютинины иммобилизованных частиц вируса. С помощью большого набора антигемагглютининовых антител было продемонстрировано, что антигенная структура искусственного додекапептида F/A действительно соответствует антигенной детерминанте субъединиц  $\text{HA}_2$ . Одноразовое введение искусственного конъюгата пептид-полиион сопровождалось образованием антител изотипа IgG, которые опознавали детерминанту F/A и не реагировали с другими белками вириона [32].

Таким образом путем соединения гаптенных или слабоиммуногенных антигенов с молекулами неприродных полиэлектролитов созданы искусственные иммуногены нового типа. Эти антигены характеризуются Т-независимостью, стимулируют антителообразование при однократной иммунизации без каких-либо дополнительных адъювантов.

Принципиально аналогичные данные получены при комплексировании поликатионов с рядом антигенов, выделенных из вирусов. К главным антигенам вируса гриппа, как известно, относятся уже упоминавшийся гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА). НА и НА локализируются на поверхностной оболочке вириона, штаммоспецифичны, в очищенном виде слабоиммуногенны и дрейфуют независимо друг от друга. Считается, что НА и НА обладают протективной активностью.

Искусственные конъюгаты (НА) вируса гриппа с синтетическими полиэлектролитами также оказались сильнодействующими иммуногенами [22,28,29].

Выделенные вирусные антигены ковалентно связывались с синтетическим полиионом.

Поскольку антитела к вирусу гриппа, направленные против НА, нейтрализуют вирус, можно было ожидать, что высокоиммуногенные конъюгаты, содержащие НА, будут оказывать определенное протективное действие. Действительно, животные, иммунизированные конъюгатом, оказались полностью резистентными к патогенному варианту гомологичного вируса. При иммунизации аналогичной дозой изолированного НА выживало только 20% животных.

Примером искусственной вакцины против бактериальной инфекции может служить следующий вариант антиген-полиионного комплекса [1,25]. Исследования проводились на модели мышинного тифа, вызываемого *Salmonella typhimurium* – естественной для мышей

инфекцией. Невозможность получения высокого защитного эффекта при вакцинации генотипов, низкореагирующих на антигены сальмонелл, вызывает необходимость исследований фенотипической коррекции иммунного ответа на данные антигены. В предварительных исследованиях было показано, что введение мышам разных линий наряду с О - антигеном (липополисахарид стенки бактерий) или Н-антигеном (белок жгутикового аппарата бактерий) ПАК, ПВП или СП обеспечивает усиление специфического иммунного ответа на оба антигена, причем стимуляция антителогенеза была сильнее выражена у низкореагирующих на каждый конкретный антиген линий мышей. Таким образом, происходило нивелирование межлинейных различий иммуногенеза на О- и Н антигены, то - есть использованные полиэлектролиты обеспечивают фенотипическую коррекцию генного контроля иммунного ответа на основные антигены сальмонелл.

Далее исследованы протективные свойства конъюгатов антигенов сальмонелл с синтетическими полиэлектролитами. Мышей иммунизировали конъюгатами ПАК или СП с полисахаридом О - антигена и Н-антигеном *Salmonella*. Затем животных заражали вирулентным штаммом *Salmonella typhimurium* в дозе 20-100 LD<sub>50</sub>. После введения такой дозы микробов интактным (контрольным) животным наблюдалась их 100%-ная гибель в течение первых пяти-семи суток. Конъюгаты антигенов с полиэлектролитами защищали животных от гибели практически при всех использованных дозах. Исходные антигены, в частности полисахарид сальмонелл, защищал животных лишь при введении очень высоких доз. Определение показателя ЕД<sub>50</sub> по Керберу, который позволяет оценить минимальную дозу вакцинирующего препарата, обеспечивающую защиту 50% зараженных животных, показывает, что в целом конъюгирование полисахарида и Н-белка с полиэлектролитом приводит к получению искусственной вакцины, защитная эффективность которой в 10-50 раз превышает эффективность исходного антигена.

В последние годы в Институте иммунологии группой исследователей [5,6,35] разработана гриппозная вакцина нового поколения на основе вышеописанной технологии химического соединения антигена с иммуностимулирующим полимером. Вакцина получила название "Гриппол", в доклинических и клинических испытаниях показала высокую эффективность и полную безопасность. В 1991 году она зарегистрирована Минздравом и рекомендована к широкому медицинскому применению и промышленному производству. Вакцинация "Грипполом" индуцирует синтез антител изотипов М, G (1,2а, 2b, 3) и А но не Е, приводит к интенсивному формированию Т-хелперных и Т-киллерных лимфоцитов. Это обеспечивает высокоэффективный специфический гуморальный и клеточный иммунитет к вирусу гриппа.

В последние годы [41,42,43,44] путем конъюгирования ряда аллергенов, выделенных из пыльцы тимopheевки, березы и других, с синтетическими полимерными носителями, обладающими способностью к подавлению IgE-синтеза и/или переключению его на IgG-антитела (блокирующие), удалось получить препараты, обладающие свойствами "аллерговакцин", т.е. высокоэффективных новых средств для специфической иммунотерапии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Алексеева Н.Ю., Апарин П.Г., Вафина М.Г., Некрасов А.В.* // Иммунология - 1986. - No1, - С. 32 - 36.
2. *Атауллаханов Р.И.* // Мол.генетика,микробиол.,вирусолог. -1983. - No1, - С. 37-39.
3. *Атауллаханов Р.И., Петров Р.В., Хаитов Р.М. и др.* // Докл.АН СССР - 1984. - т.274, - No2, - С. 479 - 482.
4. *Атауллаханов Р.И., Губарев М.И., Гончаров В.В.* // Иммунология - 1985. - No2, - С. 27-30.
5. *Ельшина Г.А., Горбунов М.А., Хаитов Р.М. и др.* // Военно-мед.журнал, - N8, - 1996, - С.57 -60.
6. *Ельшина Г.А., Горбунов М.А., Хаитов Р.М. и др.* // Военно-мед.журнал, - N11, - 1996, - С.53 - 55.
7. *Кабанов В.А., Топчиев Д.А.* Полимеризация ионизирующихся мономеров. - М.- 1975.
8. *Кабанов В.А., Евдаков В.П., Мустафаев М.И., Антипина А.Д.* // Молекул. биол. - 1977. - Т.11. - Вып.3, - С. 582-597.
9. *Кабанов В.А., Мустафаев М.И., Норимов А.Ш. и др.* // Доклады АН СССР - 1978. - Т.243. - No5, - С. 1130 - 1133.
10. *Кабанов В.А., Мустафаев М.И., Гончаров В.В.* //Высокомол. соедин. - 1981. - Т.23. - No2, - С. 261-270.
11. *Кабанов В.А., Петров Р.В., Хаитов Р.М.* // Журн. Всесоюзн. хим. общества им. Д.И.Менделеева. - 1982. Т. 27, - No4, - С.417-428.
12. *Кабанов В.А., Мустафаев М.И., Некрасов А.В. и др.* // Докл. АН СССР. - 1984. Т.274, - No4, - С. 998-1001.
13. *Нажмитдинов А.М., Дишкант И.П., Хаитов Р.М.* // Иммунология.- 1980. - No2, - С. 50-52.
14. *Норимов А.Ш., Некрасов А.В., Сивук Н.Е. и др.* // Иммунология -1983. - No4, - С. 43-45.
15. *Норимов А.Ш., Некрасов А.В., Сивук Н.Е. и др.* // Иммунология -1983. - No6, - С. 24-27.
16. *Петров Р.В., Гвоздецкий А.Н., Горохов А.А., Евдаков В.П. и др.* // ЖМЭИ. - 1974. - No11. - С. 37-40.
17. *Петров Р.В.* Иммунология и иммуногенетика. - М., 1976.
18. *Петров Р.В., Хаитов Р.М.* // МРЖ. -1976.
19. *Петров Р.В., Евдаков В.П., Хаитов Р.М.* // Докл.АН СССР, - 1977. - No 5. - С. 1260 - 1263.
20. *Петров Р.В., Хаитов Р.М.* // Успехи современной биологии. - 1979. - Т. 88, - No 6. - С. 307-321.
21. *Петров Р.В., Хаитов Р.М., Норимов А.Ш. и др.* // Докл.АН СССР - 1979. - Т. 249, - No1, - С. 249 - 252.
22. *Петров Р.В., Жданов В.М., Кабанов В.А. и др.* // ЖМЭИ. - 1981.- No2, - С. 58-63.
23. *Петров Р.В., Хаитов Р.М., Манько В.М., Михайлова А.А.* Контроль и регуляция иммунного ответа. // М., - Медицина, -1981., С.311.
24. *Петров Р.В.* Иммунология. - М.,- Медицина,-1982. - С.368
25. *Петров Р.В., Кабанов В.А., Хаитов Р.М. и др.* // Докл.АН СССР.- 1983.- Т.270,- No5, - С.1257 - 1259.
26. *Петров Р.В., Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.И.* Иммуногенетика и искусственные антигены. - М., 1983.
27. *Петров Р.В., Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.И.* // Биол.мембраны - 1984. - Т.1 - No6, -



- С. 599 -604.
28. Петров Р.В., Жданов В.М., Хаитов Р.М. // Докл.АН СССР.- 1984.- Т.277,- No3, - С.720 - 722.
  29. Петров Р.В., Жданов В.М., Кабанов В.А. и др. // Докл.АН СССР.- 1984.- Т.277,- No3, - С.752 - 755.
  30. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Норимов А.Ш. и др. // Иммунология- 1985. - No2, - С. 21 -24.
  31. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Лиознер А.Л. и др. // Иммунология- 1985. - No5, - С. 24 -27.
  32. Петров Р.В., Кабанов В.А., Хаитов Р.М. // Иммунология- 1986. - No1, - С. 5 - 24.
  33. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Искусственные вакцины. - М.:ВНИИМИ. 1986. - С. 81.
  34. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Искусственные антигены и вакцины. - М.: Медицина. 1988. - С. 287.
  35. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Некрасов А.В. и др. Способ получения вакцины против вируса гриппа. // Патент No 1580617.
  36. Сивук Н.Е., Петров Р.В., Хаитов Р.М. и др. // Иммунология - 1985. - No6, - С. 57 - 59.
  37. Хаитов Р.М., Норимов А.Ш., Завгородний С.Г. // Иммунология. -1980. - No2, - С. 47-50.
  38. Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.И., Сижорова Е.В. // Иммунология- 1982. - No5, - С. 31-33.
  39. Хаитов Р.М., Маджидов А.В., Некрасов А.В. // Иммунология. - 1984. - No2, - С. 18-21.
  40. Хаитов Р.М., Февралева И.С., Атауллаханов Р.И., Фукс Б.Б. // Иммунология. - 1987. - No1, - С. 28-30.
  41. Хаитов Р.М., Полсачева О.В., Порошина Ю.А. // Иммунология - 1994. - No2, - С. 37 -40..
  42. Хаитов Р.М., Федосеева В.Н., Некрасов А.В. и др. // Иммунология - 1996. - No6, - С. 40 - 42.
  43. Хаитов Р.М., Федосеева В.Н., Некрасов А.В. и др. // Иммунология - 1996. - No6, - С. 42 - 45.
  44. Хаитов Р.М. //I-Нац. конф. РААКИ . Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии (Сборник трудов).- 1997.- С. 106-112.

## THE DEVELOPMENT OF A NEW GENERATION OF VACCINES ON THE BASIS OF STRUCTURAL CONJUGATES OF ANTIGEN AND SYNTHETIC POLYMER IMMUNOMODULATORS

R.M. Khaitov

State Research Centre - Institute of Immunology, Moscow

The immunogenetic principle of creation of artificial antigens and vaccines possessing the abnormal immunogenicity and having capability to induce the high immune response in weakly reacting individuals have been suggested and proved by experiment. The vaccines of a new generation against the grippe pathogene, salmonellosis have been developed on the basis of this principle. In theory the methods of receiving allergovaccines for allergy disease therapy have been worked out and based.

**Key Words:** vaccine, antigen, synthetic polymer immunomodulators