

УДК 577.352.610. 616.9-097: 614.47

©Коллектив авторов

## РАЗРАБОТКА НОВОГО АДЬЮВАНТНОГО ЛИПИД-САПОНИНОВОГО КОМПЛЕКСА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫМ АНТИГЕНОМ

*А.В. Цыбульский<sup>1\*</sup>, Н.М. Санина<sup>1</sup>, И.А. Ли<sup>2</sup>, А.М. Попов<sup>2</sup>, Э.Я. Костецкий<sup>1</sup>,  
О.Ю. Портнягина<sup>2</sup>, В.Л. Шныров<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Дальневосточный государственный университет, г.Владивосток, 690950, ГСП, ул. Октябрьская, 27; тел./факс: (4232)455139; эл. почта: vitauct@yahoo.com

<sup>2</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, г.Владивосток

<sup>3</sup>Саламанский университет, г.Саламанка, Испания

Представлены результаты экспериментов по модификации ИСКОМной матрицы путём замены структурных компонентов ИСКОМ фосфатидилхолина и сапонины QuilA на соединения морского происхождения, обладающие иммуномодулирующими и адьювантными свойствами: гликолипид моногалактозилдиацилглицерол и тритерпеновый гликозид кукумариозид А<sub>2</sub>-2 (КД) соответственно. Полученный комплекс включает морфологические структуры двух типов: ИСКОМ-подобные формирования с характерной для них морфологией и размерами, а также тубулярные структуры диаметром около 40 нм и длиной 150-400 нм. Эти структуры, названные нами ТИ-комплексами, характеризуются отсутствием токсичности, характерной для ИСКОМ, они способны включать амфифильный белковый антиген и обеспечивать иммуноадьювантный эффект при экспериментальной иммунизации. В условиях экспериментальной иммунизации слабых по иммуногенному потенциалу мышей антигеном порином – субъединичным поровым мембранным белком, выделенным из *Y. pseudotuberculosis*, ТИ-комплексы с антигеном обеспечивали более выраженный иммунный ответ гуморального типа к этому антигену, чем комплексы порина с ИСКОМами классической структуры, липосомами и полным адьювантом Фрейнда. Сделан вывод о перспективности дальнейших исследований ТИ-комплексов как нового типа адьювантных носителей для антигенов.

**Ключевые слова:** адьювант, ИСКОМ, тритерпеновый гликозид, моногалактозилдиацилглицерол (МГДГ), вакцина, порин.

**ВВЕДЕНИЕ.** В современных технологиях изготовления вакцинных препаратов большое внимание уделяют проблеме поиска и конструирования различных носителей антигенов, предназначенных для доставки антигена к иммунокомпетентным клеткам в оптимальной форме, направленного транспорта антигена, защиты антигена от биodeградирующих механизмов; такого рода

\* - адресат для переписки

носители оказывают также адьювантный эффект за счет собственной иммуномодулирующей активности носителя [1]. Актуальность проблемы адьювантных носителей повысилась в последние годы в связи с применением субъединичных антигенов, имеющих существенные преимущества в плане безопасности, но часто оказывающихся слабыми иммуногенами. Наиболее динамично исследования в области адьювантных носителей развивались применительно к носителям на основе различных липидных матриц, в частности, липосом - везикул с гидрофобной и гидрофильной фазами. Однако практическое использование вакцинных препаратов на основе липосом ограничивается рядом недостатков, к которым относятся химическая и физическая нестабильность везикул, относительно умеренный иммунный ответ и даже его отсутствие за счет экранирования эпитопов, недостаточная стандартизация процессов включения антигена в различные фазы липосом. Делаются попытки обойти эти ограничения путем различных модификаций структуры липосом [2-4], однако, в настоящее время акцент исследований в области липидных носителей антигенов сместился к изучению иммуностимулирующих комплексов (ИСКОМ), состоящих из сапонинов, выделенных из *Quillaja saponaria*, холестерина и нейтральных фосфолипидов. Сапонины QuilA в составе носителя обладают иммуностимулирующими свойствами, а их комплексы с холестерином необходимы для структурирования липидной матрицы ИСКОМ [5]. Применение антигена в составе ИСКОМ позволяет индуцировать существенный специфический иммунный ответ гуморального и клеточного типа при использовании доз антигена намного меньших, чем в обычных вакцинах [6]. Однако, несмотря на интенсивные исследования и их достаточно убедительные результаты, подтверждающие адьювантную активность ИСКОМ в отношении большого диапазона бактериальных, вирус – и опухолеспецифических антигенов, ИСКОМы пока внедрены только в практику вакцинации животных. Основным недостатком ИСКОМ как системы доставки антигенов является токсичность при парентеральном введении препарата, главной причиной которой является относительно высокая гемолитическая активность сапонинов QuilA [7-9]. В связи с этим в настоящее время ведутся работы, направленные на снижение токсичности ИСКОМ за счет модификации сапонинового компонента. Проводится различной глубины очистка QuilA с выделением из него структурных компонентов [10]. В результате действительно достигается снижение токсичности сапонины, сопровождаемое, однако, уменьшением адьювантной активности или даже потерей самой способности к формированию ИСКОМ [11].

Мы применили другую стратегию - модификацию ИСКОМ заменой липидной компоненты на эффекторные глицерогликолипиды моногалактозилдиацилглицеролы (МГДГ) из морских макрофитов, проявляющих противовоспалительные свойства [12], а сапониновой - на тритерпеновый гликозид из дальневосточной промысловой голотурии *Cucumaria japonica*, обладающий иммуномодулирующей активностью [13, 14]. Такой подход направлен как на снижение токсичности, так и повышение адьювантной активности липид-сапонинового комплекса. Ранее нами было показано [15, 16], что замена в ИСКОМах фосфатидилхолина (ФХ) на МГДГ не вызывает изменения структуры ИСКОМ. Мы подтвердили это положение при использовании МГДГ из четырех различных источников, а также установили, что двойная замена в структуре ИСКОМ - ФХ на МГДГ, а QuilA на тритерпеновый гликозид морского происхождения - приводит к появлению качественно новой тубулярно-ИСКОМной структуры, названной нами ТИ-комплексами [17].

Задача настоящего исследования состояла в разработке способа получения антиген-содержащих липид-сапониновых ТИ-комплексов, проведении сравнительной оценки их эффективности с известными адьювантными носителями и обосновании возможности применения ТИ-комплексов в качестве вакцинных препаратов.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали беспородных белых мышей и мышей линии СВА массой 20-25 г. разведения вивария ТИБОХ ДВО РАН. Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986), в стандартных условиях вивария, в пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой. Животные получали гранулированный корм ПК 120-3.

ФХ был получен в соответствии с методикой [18]. Использовали холестерин (Хол), сапонин из *Quillaja saponaria* (QuillA), октилглюкозид, меченые пероксидазой антимышинные иммуноглобулины Ig (M+G) производства "Sigma-Aldrich Co.", (США).

МГДГ выделяли из морских макрофитов *Laminaria japonica*, *Zostera marina*, *Ulva finistrata*, *Ahnfeltia tobuchiensis* по ранее описанной методике [19].

Кукумариозид А<sub>2</sub>-2 (КД) – тритерпеновый гликозид из *Cucumaria japonica*, был любезно предоставлен В.М. Богуславским, сотрудником лаб. химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН.

Липид-сапониновые комплексы получали в соответствии с методикой [17]. Полученные данной процедурой препараты представляют собой водную суспензию липид-гликозидных комплексов, стабильную при температуре (-4°C) более трех месяцев. Образующиеся липид-сапониновые комплексы оценивали электронно-микроскопически при увеличении  $\times 50000$  как описано ранее [15]. В зависимости от электронно-микроскопической картины выделяли тубулярно-ИСКОМные (ТИ) комплексы, тубулярно-липосомальные (ТЛ) комплексы, классические ИСКОМы и ИСКОМы, модифицированные заменой ФХ на МГДГ (ИСКОМ-МГДГ).

Собственную иммуноадьювантную активность компонентов ТИ-комплекса оценивали по влиянию препаратов МГДГ и КД на интенсивность реакций клеточного и гуморального иммунного ответа при иммунизации беспородных белых мышей Т-зависимым корпускулярным антигеном – эритроцитами барана (ЭБ). Мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили ЭБ в дозе  $5 \times 10^6$  клеток в объеме 0,5 мл физиологического раствора. Одновременно с введением ЭБ, вводили в/б или подкожно (п/к) КД (в дозах 0,01 и 0,1 мкг/мышь) или МГДГ (в дозах 0,5 и 10 мкг/мышь) в объеме 0,2 мл ФСБ. В качестве положительного контроля использовали полный адьювант Фрейнда (ПАФ), который одновременно с иммунизацией ЭБ вводили п/к в объеме 0,2 мл. Разрешающую дозу ЭБ для ГЗТ ( $2,5 \times 10^6$  ЭБ) вводили мышам на 6-й день после иммунизации в подушечку одной из лапок в объеме 0,02 мл ФСБ. В контролатеральную лапку вводили такой же объем ФСБ. Забой животных производили на 7-й день после иммунизации с последующим определением активности эффекторов гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), специфичных к ЭБ, методом расчета индекса воспаления (ИВ) ГЗТ в %.

На 14-21 день после иммунизации у мышей получали сыворотку крови и определяли содержание в ней специфических антител против ЭБ в реакции прямой гемагглютинации. За титр антител принимали обратную величину, соответствующую максимальному разведению сыворотки, при которой наблюдалась реакция агглютинации ЭБ, и выражали в  $\log_2$ .

В качестве объектов сравнения при изучении иммуноадьювантных свойств ТИ-комплекса использовали липидные носители, способные переносить антиген и обеспечивать адьювантный эффект: ПАФ, классические ИСКОМы, ТЛ-комплексы, ИСКОМ-МГДГ.

В качестве модельного антигена использовали термически обработанную, гидрофобную, мономерную форму порообразующего белка наружной мембраны возбудителя псевдотуберкулеза *Yersinia pseudotuberculosis* с молекулярной массой около 36 кД, который был получен согласно ранее опубликованной методике [20].

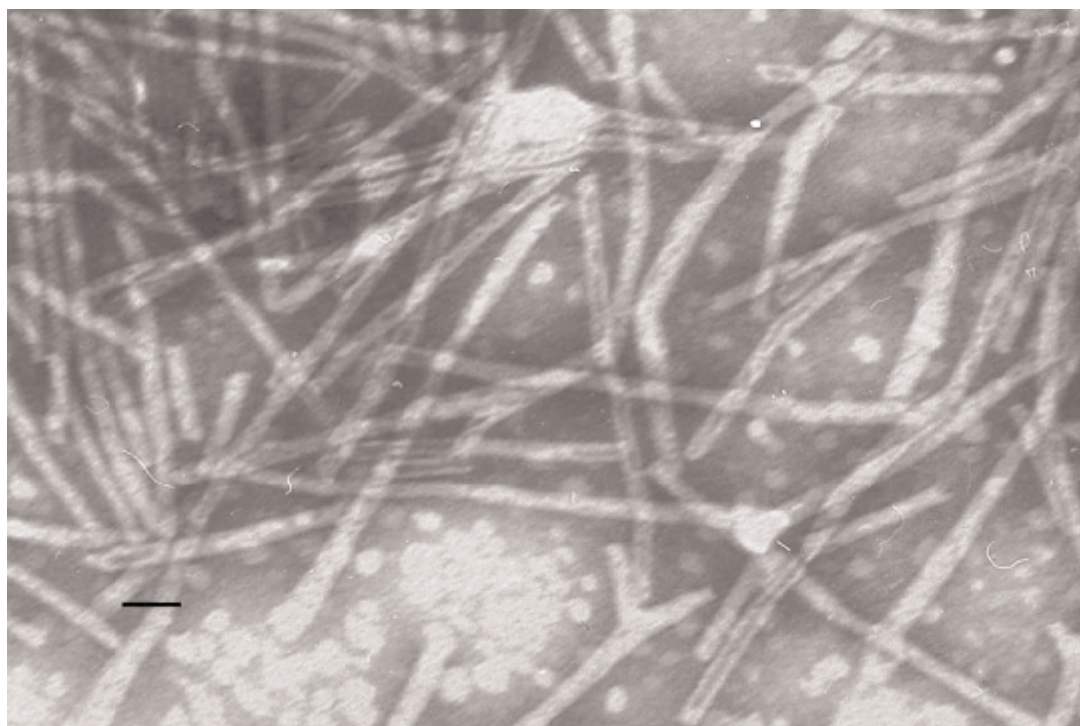
Порин-содержащие ТИ-комплексы получали из КД, холестерина и МГДГ, взятых в весовом соотношении 3:2:6, с последующим добавлением поринового белка в необходимой концентрации в ФСБ (рН 7,2) в дозах, соответствующих 0,1-1-10 мкг белка на 1 мкг содержания КД, а именно: 75 мкг, 750 мкг или 7500 мкг на 1 мл полученной смеси. Полученную смесь озвучивали ультразвуковым дезинтегратором в течение 2 мин согласно [15]. Подлинность препарата определяется качественным и количественным составом исходных структурных компонентов (КД, холестерина и МГДГ). Для оценки связывания порина с ТИ-комплексом проводили ультрацентрифугирование при 45000 g в течение 45 минут. Содержание несвязанного белка определяли в надосадочной жидкости методом Лоури.

Иммунизацию мышей порином самостоятельно и в составе липидных комплексов производили в/б в дозах 0,01, 0,1, 1, 10, 20, 50 мкг/мышь в объёме 0,2 мл ФСБ. Порин вводили в составе ТИ-комплексов, ИСКОМ, ИСКОМ-МГДГ, ТЛ-комплексов и в смеси с ПАФ. Мышей иммунизировали дважды, повторную иммунизацию производили через 14 дней после первой. Содержание специфических антипориновых антител определяли в сыворотке крови мышей методом иммуноферментного анализа в модификации [20]. Измерение оптической плотности производили на планшетном спектрофотометре EL4800 “Bio-Tek instruments Inc.”, (США) при длине волны 492 нм. Содержание антипориновых антител выражали в единицах оптической плотности (ОП) при длине волны 492 нм.

Статистическую обработку результатов проводили методом параметрического анализа с использованием критерия *t*-Стьюдента и методом доверительных интервалов. В работе представлены результаты экспериментов с достоверностью  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** При проведении с помощью электронной микроскопии скрининга различных липидов и сапонинов морского происхождения как потенциальных компонентов ИСКОМ, мы получали различные по морфологии липид-сапонин-холестериновые комплексы. Наибольший интерес вызвали комплексы в виде комбинации тубулярных и ИСКОМ-подобных суперструктур, полученные путем замены ФХ на МГДГ из морской водоросли *Ulva finistrata*, а смеси сапонинов QuilA – на конкретный тритерпеновый гликозид КД из голотурии *Cucumaria japonica*. На рисунке 1 представлена электронно-микроскопическая фотография этого комплекса. Можно видеть, что наряду с классическими гексагональными структурами, характерными для ИСКОМ, образуются тубулярные вытянутые формы, имеющие диаметр, сопоставимый с диаметром ИСКОМ (около 40 нм), и длину от 150 до 400 нм. Данная комбинация тубулярных и искомоподобных структур была названа нами тубулярно-ИСКОМным комплексом (ТИ-комплексом). Следует отметить, что для образования таких структур требовалось присутствие в комплексе как МГДГ, так и КД. Если замена фосфолипида на гликолипид не изменяла классическую для ИСКОМ гексагональную структуру, то замена только QuilA на КД приводила к образованию сети тубул и липосомоподобных везикул (эти структуры названы нами тубулярно-липосомальными (ТЛ) комплексами). ИСКОМ-подобных структур в последнем случае не обнаруживалось. Таким образом, для эффективной модификации ИСКОМной матрицы, при которой наряду с другими структурами сохраняется присутствие классических ИСКОМ, необходимыми оказались оба компонента – гликолипид МГДГ и КД. Это подчёркивает новизну нашего подхода к модификации ИСКОМ в сравнении с работами ряда других авторов, основанными только на замене фосфолипидной составляющей [21], в результате чего получают ИСКОМы, морфология и активность которых принципиально не отличается от приготовленных на основе фосфолипидов. При детальном анализе получаемых структур выявляется интересная закономерность – тубулы оказываются заполненными ИСКОМ-подобными структурами, выполняя таким образом функцию своеобразного “контейнера ИСКОМ”, который, возможно, обладает способностью к постепенному высвобождению ИСКОМ, пролонгируя процесс их деградации.





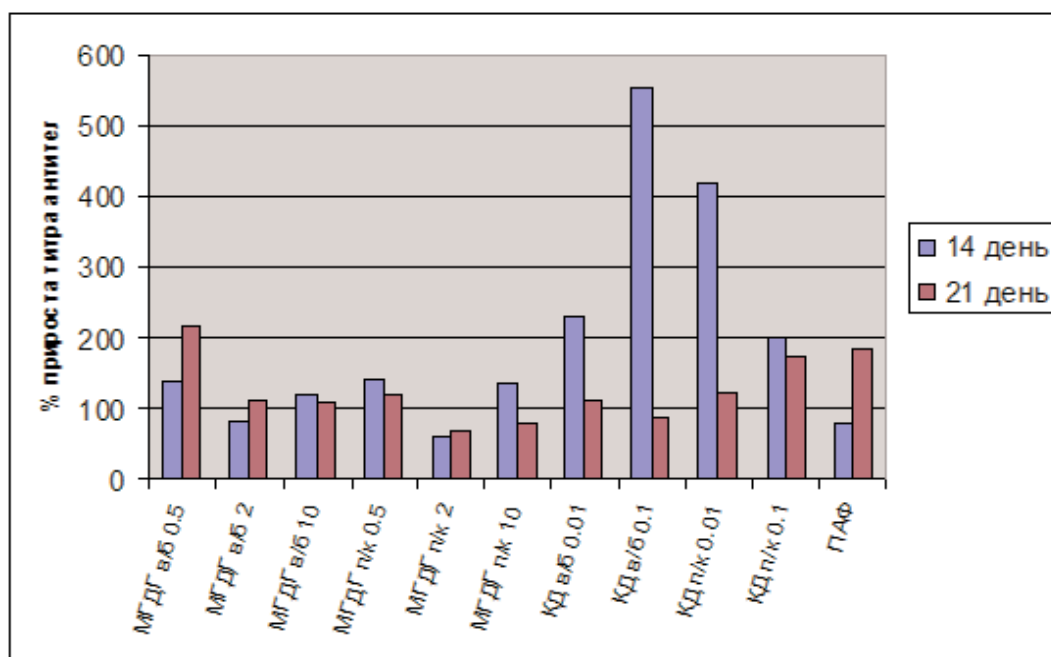
**Рисунок 1.**

Электронно-микроскопическая фотография ТИ-комплекса при соотношении компонентов в системе КД: холестерин: МГДГ : порин (3:2:6:0,3).  
Длина масштабной линии 100 нм, увеличение  $\times 50000$ .

Таким образом, исполненная нами процедура модификации ИСКОМ привела к формированию принципиально новых морфологических образований - ТИ-комплексов. При этом выявлено существенное преимущество ТИ-комплекса в сравнении как с классическими, так и модифицированными ИСКОМ, - в связи с образованием устойчивого комплекса КД с холестерином гликозидный компонент не проявлял гемолитической токсичности, характерной для QuilA в составе ИСКОМ [17], т.е. ИСКОМы в составе ТИ-комплекса не имели характерной токсичности.

Изучение иммуoadъювантных свойств этого типа липид-сапониновых носителей антигенов проводилось с использованием в качестве модельного антигена мембранного порового белка из *Yersinia pseudotuberculosis* с молекулярной массой около 36 кД. При электронно-микроскопическом исследовании установлено, что процесс взаимодействия порина с ТИ-комплексом не нарушает морфологическую структуру этого комплекса. Связывание порина с ТИ-комплексами происходит с высокой эффективностью - до 95% от свободного белка включается в ТИ-комплекс, т.е. поровый белок легко включается в липидную матрицу ТИ-комплекса и потенциально представляет собой вакцинный препарат.

Предваряя оценку адъювантной активности ТИ-комплексов, мы провели серию экспериментов с целью анализа собственной адъювантной активности структурообразующих единиц ТИ-комплекса: КД и МГДГ. Ранее было показано, что препарат КД не проявляет эмбриотоксических и мутагенных свойств, повышает неспецифическую устойчивость к бактериальным и вирусным инфекциям в чрезвычайно низких (нетоксичных для организма) дозах [13, 14, 22]. Нами экспериментально показано, что препараты КД и МГДГ проявляют самостоятельную иммуномодулирующую активность (рис. 2, 3), в этом имеется различие с компонентами классических ИСКОМ, где иммуномодулирующий потенциал определяется активностью сапонинов QuilA, тогда как фосфолипидная составляющая предполагается иммунологически инертной.

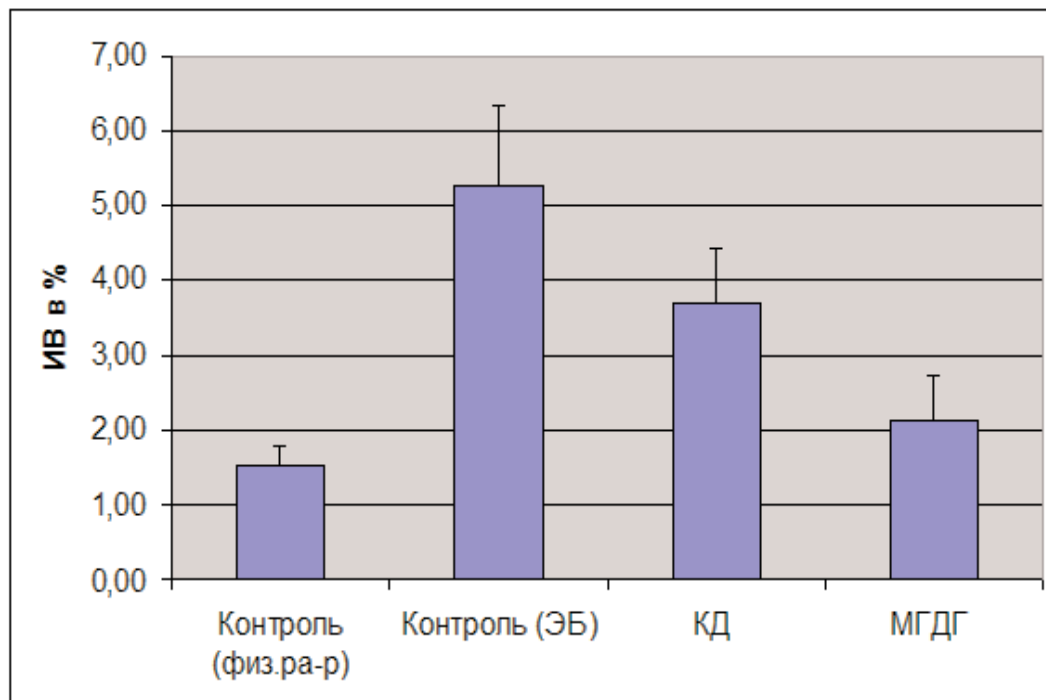


**Рисунок 2.**

Адьювантное действие МГДГ и КД в отношении гуморального иммунного ответа беспородных белых мышей при иммунизации ЭБ при в/б введении (14 и 21 дней после иммунизации).

По оси абсцисс – экспериментальные группы животных.

По оси ординат – процент прироста титра антиэритроцитарных антител в сравнении с группой мышей, иммунизированных только ЭБ.



**Рисунок 3.**

Модулирующее действие МГДГ и КД при в/б введении в отношении эффекторов ГЗТ при иммунизации ЭБ (7 дней после введения иммунизирующей дозы ЭБ и 1 день после введения разрешающей дозы).

По оси абсцисс – экспериментальные группы животных. По оси ординат – ИВ ГЗТ в %.

На рисунке 2 представлено адъювантное действие структурообразующих компонентов ТИ-комплекса на 14 и 21 день после иммунизации эритроцитами барана (ЭБ) беспородных мышей, проведенной одновременно с инъекцией соответственно МГДГ и КД в разных дозах. Представленные данные демонстрируют наличие адъювантных свойств у КД (в дозах 0,01 и 0,1 мкг/мышь) и МГДГ (в дозах 0,5, 2 и 10 мкг/мышь) при их в/б и п/к введении. Причём, эти свойства более выражены в сравнении с ПАФ. Особенно заметен прирост (до 550% от уровней контроля) гемагглютинирующих антител в первые 14 дней после иммунизации у животных, получивших КД одновременно с ЭБ. МГДГ также показал адъювантный эффект, превосходящий ПАФ, при в/б и п/к введении в дозах 0,5 мкг/мышь.

Таким образом, оба компонента ТИ-комплекса характеризуются способностью проявлять иммуноадъювантные свойства, сопоставимые с активностью адъюванта Фрейнда и даже превосходящие его при иммунизации корпускулярным Т-зависимым антигеном.

Оба препарата обладают также способностью подавлять активность эффекторов реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), что свидетельствует об их влиянии на клеточно-опосредованный иммунный ответ. При постановке классической реакции ГЗТ против эритроцитов барана, введённых в/б, одновременная в/б инъекция мышам КД и МГДГ приводила к снижению индекса воспаления (ИВ) ГЗТ (рис. 3). Особенно заметно активность эффекторов ГЗТ снижалась в группе животных, получивших МГДГ, что, видимо, является результатом влияния ацильных полиненасыщенных жирнокислотных остатков или метаболитов МГДГ, снижающих интенсивность местных воспалительных процессов. Подобная противовоспалительная активность гликолипидов из морских макрофитов показана и другими авторами, например, в отношении МГДГ, полученного из сине-зелёных водорослей [12].

Полученные нами результаты подтверждают иммуномодулирующий потенциал МГДГ и КД и позволяют предположить их положительное влияние в составе ТИ-комплекса на безопасность иммунизации (в случае МГДГ, очевидно, за счет снижения местных клеточно-опосредованных воспалительных реакций).

На следующем этапе исследований оценивалась адъювантная активность ТИ-комплексов в отношении иммунного ответа при иммунизации мышей бактериальным антигеном - субъединичным белком порином, выделенным из мембранного порового белка микобактерии *Y. pseudotuberculosis*. Результаты экспериментов по иммунизации мышей порином в большом диапазоне доз от 0,01 до 50 мкг/мышь позволили выбрать оптимальную дозу в 10 мкг/мышь, которая была использована для иммунизации самостоятельно и в составе различных липидных носителей. На рисунке 4 показаны различия в содержании специфических антипориновых антител в сыворотке крови мышей, иммунизированных порином самостоятельно и порином в составе различных адъювантных комплексов.

Результаты данного эксперимента позволяют сделать вывод о том, что иммуногенные свойства порина слабо выражены, и при самостоятельном применении он вызывает слабо выраженный специфический гуморальный иммунный ответ, практически не обеспечивающий протективного эффекта при модельной псевдотуберкулезной инфекции у мышей (данные не приведены). Применение ТИ-комплекса как носителя порина позволяет повысить выраженность этого иммунного ответа, т.е. ТИ-комплекс проявляет свойства адъювантного носителя. Уровень гуморального иммунного ответа повышается, причем ТИ-комплексы оказываются более эффективными адъювантами, чем ПАФ, ТЛ-комплексы и, что наиболее существенно, превосходят действие классических и модифицированных ИСКОМ с субъединичным поровым белком. При этом следует отметить, что замена фосфолипида в структуре ИСКОМ на гликолипид обеспечивала тенденцию к повышению адъювантной активности модифицированных ИСКОМ, однако наибольший эффект обеспечивала двойная замена фосфолипида и QuillA соответственно на МГДГ и КД, т.е. применение ТИ-комплекса.

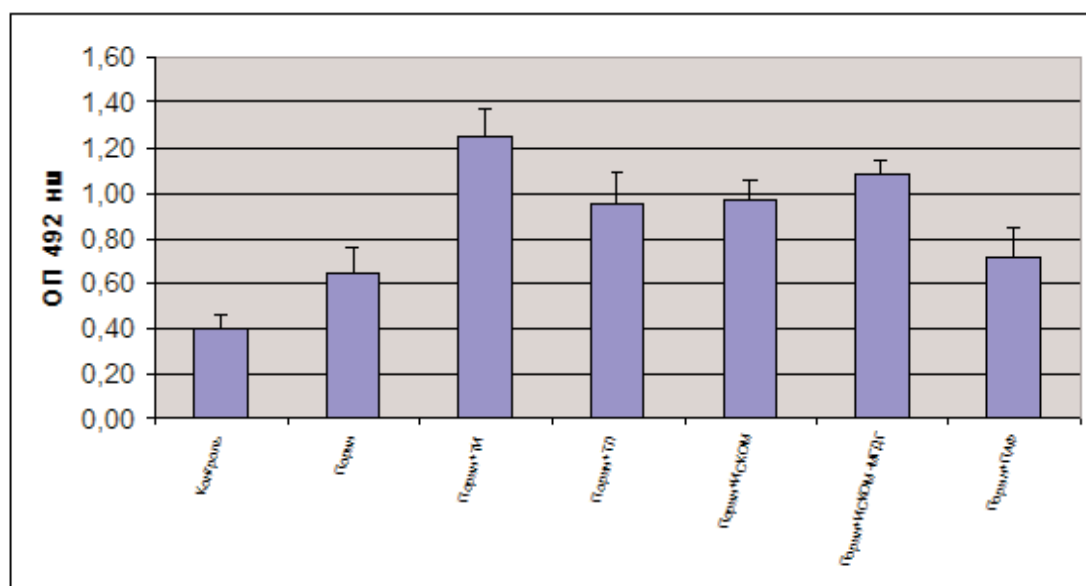


Рисунок 4.

Показатели гуморального иммунного ответа мышей при иммунизации порином в/б в дозе 10 мкг/мышь самостоятельно и в составе комплексов.

По оси абсцисс – экспериментальные группы животных.

По оси ординат – концентрация антипориновых антител в ед. ОП при длине волны 492 нм.

Мы также получили предварительные результаты, характеризующие возможность модификации гликолипидной составляющей в структуре ТИ-комплексов за счет применения МГДГ из разных видов морских макрофитов, характеризующихся существенными различиями в жирнокислотной структуре, в частности, – по коэффициенту ненасыщенности. Были изучены ТИ-комплексы с участием МГДГ из четырех различных источников морских макрофитов *Laminaria japonica*, *Zostera marina*, *Ulva finistrata*, *Anfelia tobuchiensis*. Такая замена МГДГ на гликолипид с другой жирнокислотной характеристикой не приводила к изменениям морфологической суперструктуры ТИ-комплексов, однако, оказывалась способной модифицировать собственную иммуномодулирующую активность ТИ-комплексов и существенно изменять его адьювантную активность. Это является темой дальнейших исследований, в том числе – с применением вирусоспецифических антигенов.

### ВЫВОДЫ.

1. Замена в матрице ИСКОМ фосфолипида на МГДГ из морских макрофитов позволяет сохранить суперструктуру и адьювантную функцию, характерные для ИСКОМ.

2. Замена в матрице ИСКОМ одновременно фосфолипида на МГДГ и сапонины QuilA на кумариозид  $A_2-2$  приводит к качественному изменению образуемых суперструктур: наряду с классическими гексагональными структурами, характерными для ИСКОМ, образуются тубулярные структуры диаметром, сопоставимым с диаметром ИСКОМ (около 40 нм) и длиной 100-400 нм – тубулярно-искомальные (ТИ) комплексы.

3. Входящие в структуру ТИ-комплексов МГДГ и КД на модели иммунного ответа к корпускулярному антигену (эритроциты барана) показывают наличие собственной иммуномодулирующей активности – адьювантное действие МГДГ и КД, превосходящее по интенсивности действие ПАФ, взятого в качестве положительного контроля, в отношении гуморального иммунного ответа.



4. МГДГ и КД проявляют супрессорное действие при иммунизации мышей ЭБ в отношении активности эффекторов ГЗТ. С одной стороны, эти результаты говорят об отсутствии у препаратов МГДГ и КД собственного адъювантного потенциала в отношении механизмов клеточного иммунитета, с другой – характеризуют безопасность их применения, в частности, за счет местной противовоспалительной активности МГДГ.

5. При иммунизации животных слабым по иммуногенным свойствам белком – порином из *Y. pseudotuberculosis* – ТИ-комплексы способны усиливать иммуногенность порина, т.е. проявляют свойства адъювантного носителя. Уровень гуморального иммунного ответа повышается более значительно, чем при применении других адъювантных носителей с порином: ПАФ, классических ИСКОМ, модифицированных ИСКОМ-МГДГ и ТЛ-комплексов.

6. Показана возможность модификации гликолипидной составляющей в структуре ТИ-комплексов за счет применения МГДГ из различных макрофитов, характеризующихся существенными различиями в структуре жирнокислотного остатка, в частности – по коэффициенту ненасыщенности.

Работа выполнена при поддержке грантов NATO CLG 980842, Министерства образования РФ–РНП.2.1.1.2641 и CRDF-RUXO-003-VL-06.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bomford R. (1990) In: Control of infectious disease. (Dimmock N.J., Griffiths P.D., Madeley C.R., eds.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 143-154.
2. Babai I., Barenholz Y., Zakay-Rones Z. et al. (2001) Vaccine, **20**, 505-515.
3. Lasic D.D. (1995) In: Handbook of Biological Physics Vol.1, (R. Lipowsky, E. Sackmann, eds.), Elsevier Science B.V., pp. 491-519.
4. Van Slooten M.L., Boerman, O., Romoren et al. (2001) Biochim. Biophys. Acta, **1530**, 134-145.
5. Morein B., Lovgren K., Hoglund S., Sundquist B. (1987) Immunol. Today, **8**, 333-338.
6. Morein B., Lovgren K., Hoglund S. (1989) In: Immunological adjuvants and vaccines. (Gregoriadis G. ed.) Plenum Press, New York, pp. 153-162.
7. Gupta R.K., Relyverd E.H., Lindblad E.B et al. (1993) Vaccine, **11**, 293-306.
8. Mowat A.M., Donachie A.M., Reid G., Jarrett O. (1991) Immunology, **72**, 317-322.
9. San Gil F., Turner B., Mullbacher A. et al. (1998) Scand. J. Immunol., **47**, 243-253.
10. Kensil C.R., Patel U., Lennick M., Marciani D. (1991) J. Immunol., **146**, 431-437.
11. Ronnberg B., Fekadu M., Behboudi S. et al. (1997) Vaccine, **15**, 1820-1826.
12. Bruno A., Rossi C., Marcolongo G. et al. (2005) Eur. J. Pharmacol., **524**, 159-168.
13. Седов А.М., Аполлонин А.В., Севастьянова Е.К. и др. (1990) Антибиотики и химиотерапия, **35**, 23-27.
14. Aminin D.L., Pinegin B.V., Pichugina L.V. et al. (2006) Int. Immunopharmacol., **6**, 1070-1082.
15. Лу И.А., Попов А.М., Санина Н.М. и др. (2004) Известия РАН. Сер. биол., **3**, 299-304.
16. Lee I.A., Popov A.M. Sanina N.M. et al. (2004) Acta Biochimica Polonica, **51**, 263-272.
17. Костецкий Э.Я., Попов А.М., Санина Н.М. и др. (2006) Носитель и адъювант для антигенов. Заявка на патент № 2006104795/13(005189) от 15.02.2006 г.
18. Singleton W.S., Gray M.S., Brown M.Z., White G.Z. (1965) J. Am. Oil Chem. Soc., **42**, 53-56.
19. Sanina N.M., Goncharova S.N., Kostetsky E.Y. (2003) In Advanced Research on Plant Lipids. (Murata et al, eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 385-388.

20. *Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Вострикова О.П., Соловьева Т.Ф.* (1999) Бюлл. эксп. биол. мед., **128**, 437–440.
21. *Charles S.D., Nagaraja K.V., Sivanandan V.* (1993) Avian Dis., **37**, 477-484.
22. *Калинин В.И., Левин В.С., Стоник В.А.* (1994) Химическая морфология: тритерпеновые гликозиды голотурий. Владивосток: Дальнаука.

Поступила: 06. 09. 2006.

ELABORATION OF NEW ADJUVANT LIPID-SAPONIN COMPLEX AND ITS USE AT  
EXPERIMENTAL IMMUNIZATION BY BACTERIAL ANTIGEN

*A.V. Tsybulsky<sup>1</sup>, N.M. Sanina<sup>1</sup>, I.A. Lee<sup>2</sup>, A.M. Popov<sup>2</sup>, E.Ja. Kostetsky<sup>1</sup>,  
O.Y. Portnyagina<sup>2</sup>, V.L. Shnyrov<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Biotechnology, Far Eastern State University, ul. Oktyabrskaya, 27, Vladivostok, 690050 Russia; tel.: 7-4232-457779; fax: 7-4232-429510; e-mail: vitauct@yahoo.com

<sup>2</sup>Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEBRAS, pr. 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, 690050 Russia; tel.: 7-4232-311661, Fax: 7-4232-314050

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca, Spain

Results of experiments on modification of immunostimulating complexes (ISCOM's) matrix by the replacement of the phospholipid for the glycolipid (monogalactosyldiacylglycerol) from sea macrophytes, and saponin Quilla to triterpene glycoside of cucumarioside A<sub>2</sub>-2 from *Cucumaria japonica* are shown. The resultant complexes include the morphological structures of two types: ISCOM-like structures with the characteristic morphology and sizes and also the tubular structures with diameter of approximately 40 nm and length of 150-400 nm. We have named these structures as TI-complexes. These TI-complexes exhibit considerably lower toxicity than ISCOM. They may include an amphiphilic protein antigen and provide immunoadjuvant effect during experimental vaccination. Under conditions of experimental immunization of mice by a weak immunogen - (subunit membrane pore protein from *Y. pseudotuberculosis*), TI-complexes with antigen provided stronger humoral immune response to antigen than the complexes of porin with classical ISCOM, liposomes and Freund's adjuvant. Thus, it's shown the prospect of the use of TI-complexes as a new type of adjuvant carriers for antigens.

**Key words:** adjuvant, ISCOM, triterpene glycoside, monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), vaccine, porin.