

УДК 616.98:579.852.11

Иммунологическая эффективность и безопасность синтезированных олигодезоксинуклеотидов CpG

© 2018 О.М. КУДРЯВЦЕВА*, А.П. СЕМАКОВА, Н.И. МИКШИС, П.Ю. ПОПОВА, В.А. КОЖЕВНИКОВ, А.В. СТЕПАНОВ, С.А. БУГОРКОВА

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Саратов, 410005

e-mail: rusrapi@microbe.ru*, kudrjavceva3074@gmail.com*

Поступила: 20.10.2017 г.

Принята в печать: 06.12.2017 г.

Описана технология синтеза и проведена оценка адъювантных свойств олигодезоксинуклеотидов CpG. Последовательности CpG-ODN синтезировали в соответствии с опубликованными данными на автоматическом синтезаторе. Адъювантную активность изучали на примере комбинации CpG-ODN с рекомбинантным протективным антигеном и белком S-слоя EA1 сибиреязвенного микроба. Установлено, что использование синтезированного адъюванта CpG 2006 в сочетании с иммуногенными антигенами приводит к развитию у экспериментальных животных напряженного и продолжительного иммунитета. Показано преимущество в адъювантной активности у синтетического препарата CpG 2006 перед альгидрогелем. В экспериментах на различных биомоделях получены данные, подтверждающие отсутствие токсического и повреждающего действия CpG-ODN на клетки и ткани макроорганизма. Выявлена активация клеточного звена иммунного ответа (содержание CD4+ и CD8+) при иммунизации штаммом *B. anthracis* СТИ-1 и прототипом рекомбинантной сибиреязвенной вакцины с CpG 2006 или альгидрогелем в качестве адъюванта во всех группах экспериментальных животных.

Ключевые слова: адъюванты, *Bacillus anthracis*, рекомбинантный протективный антиген, сибиреязвенная вакцина, сибирская язва, CpG-ODN.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-1-35-44

В настоящее время расширяются работы по получению модификаторов сигнальных путей рецепторов врожденного иммунитета. Они используются в создании нового поколения иммунобиологических препаратов для иммунопрофилактики практически всех видов патологии человека – инфекций, аллергии, аутоиммунных болезней, онкологических заболеваний и др. Применение современных адъювантов в составе вакцин решает задачу оптимального представления антигенов иммунной системе и способствует формированию выраженного иммунного ответа с развитием гуморальных и клеточных иммунных реакций. Хорошо себя зарекомендовали в роли адъювантов синтетические препараты, содержащие неметири-

ванный мотив, присущий только бактериальной ДНК – CpG-ODN. Эти олигонуклеотиды, несущие тиофосфорильные модификации, взаимодействуют с TLR 9 типа и индуцируют иммунный ответ, переключая его опосредованный вариант с Th-2 на Th-1. Активируя систему врожденного иммунитета, CpG-ODN существенным образом повышают уровень иммунного ответа даже на низкоиммуногенные антигены [1]. Считается, что ДНК с неметирированными мотивами может быть лучшим клеточным адъювантом, воздействующим на клеточные рецепторы. Комбинация CpG с различными носителями (наночастицами, микросферами, липосомами и т.п.) способствует еще большей активации антиген-специфичного ответа.

Список сокращений: ЛД₅₀ – доза, летальная для 50% тест-животных; ПА – протективный антиген; рПА – рекомбинантный ПА; CpG-ODN – цитозин-гуанин-олигодезоксинуклеотиды; TLR – толл-подобные рецепторы.

Для объяснения иммуностимулирующей активности CpG была выдвинута теория «сигнала опасности», согласно которой бактериальная ДНК, попав в организм, воспринимается иммунной системой как патогенный агент, способный вызывать инфекционный процесс. Реакция организма на ДНК, обогащенную неметилированными CpG-мотивами, заключается в первую очередь в стремительной и мощной активации различных неспецифических механизмов иммунологической защиты, представляющих собой первую «линию обороны» против инфекционных возбудителей, паразитов и трансформированных клеток. Непосредственно или как костимулирующий сигнал CpG-ODN активируют фактически все клетки иммунной системы [2]. В результате поглощения этими клетками CpG-ODN специфически взаимодействует с TLR 9 типа, которые присутствуют в цитоплазматических эндоцитозных везикулах. В результате происходит стремительная генерация реактивных форм кислорода и активации NO-синтазы. Далее происходит TLR-опосредованная активация иммунокомпетентных клеток через сигнальный каскад, вовлекающий MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88) и такие сигнальные молекулы, как IL-1 (интерлейкин-1), IRAK (Interleukin-1 Receptor-Activated Kinase) и TRAF6 (Tumor-necrosis factor Receptor-Associated Factor 6). Завершающим этапом является активация транскрипционных факторов, например, активирующего белка 1 (activating protein 1) и ядерного фактора-kB (nuclear factor-kB) [3, 4].

Среди многообразия CpG-ODN отдельные представители, в частности CpG 7909 и CpG-1018, входят в состав допущенных до клинических испытаний экспериментальных вакцин против инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы, аллергических и аутоиммунных заболеваний и онкологической патологии. Адьювант CpG 7909 (другие названия – CpG 2006, VaxImmune™) был использован при проведении около 35 клинических исследований вакцин против различных вариантов злокачественных новообразований, инфекционных болезней и инфекционных агентов биотерроризма. На сегодняшний день адьювант VaxImmune™, производимый Coley Pharmaceutical Group (с 04. 2015 г. – Merck & Co.), позиционируется как перспективный продукт для использования в вакцинных программах.

К настоящему времени опубликовано большое количество работ, где подтверждается иммуномодулирующее действие CpG-ODN в составе разрабатываемых вакцинных препаратов и приводятся

их полные нуклеотидные последовательности. Показано, что добавление CpG 7909 в коммерческие вакцины против гепатита В (Engerix-B) и гриппа (Fluarix) усиливает иммунный ответ и, следовательно, позволяет уменьшить дозировку препаратов [5]. Эффективность CpG в качестве адьюванта или средства монотерапии исследована в клинических испытаниях препаратов при раке легкого, Т-клеточной лимфоме, карциноме почек, гепатите С, пыльцевой аллергии [6–8]. CpG-ODN рассматриваются как оптимальная платформа для создания комбинированных адьювантов. Сочетание CpG-ODN и MF59 усиливает иммунную реакцию на антиген р55 вируса иммунодефицита человека [9]. Применение CpG-ODN в качестве адьюванта в клинических испытаниях одобрено Глобальным консультативным комитетом по безопасности вакцин ВОЗ.

В России исследование терапевтической эффективности, безопасности и механизмов действия синтетического олигодезоксинуклеотида CpG 7909 проводили в клинических испытаниях при метастатической меланоме (открытые неконтролируемые мультицентровые испытания II фазы в ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства) [10]. В ходе испытаний подтверждена безопасность использованного агониста TLR 9 типа – CpG 7909.

Синтетические CpG входят в состав экспериментальных вакцин, допущенных до испытаний на людях. В настоящее время на стадии клинических испытаний находится препарат AV-7909, представляющий собой химическую сибиреязвенную вакцину AVA с добавлением CpG 7909 [11, 12]. Иммуностимулирующие свойства CpG-ODN принимаются во внимание и при конструировании современных рекомбинантных вакцин для специфической профилактики чумы [13, 14]. Сообщалось, что интраназальное профилактическое введение линейным мышам CpG (без антигенов) за день до экспериментального моделирования бубонной чумы (подкожное заражение вирулентным штаммом возбудителя чумы) обеспечивает существенную защиту от развития патологических процессов в макроорганизме [15].

Нами разрабатывается прототип сибиреязвенной химической вакцины, характерными особенностями которого является наличие основного (рекомбинантный протективный антиген – рПА) и дополнительного (белок S-слоя сибиреязвенного микроба EA1) антигенов. Комплексное сравнение иммунологической эффективности препаратов, содержащих рПА, EA1 и адьюванты различных классов – гидроокись алюминия, монофосфорилированный

липид А и CpG-ODN – продемонстрировало преимущество адьювантов, способных взаимодействовать со структурами врожденного иммунитета [16].

Целью нашей работы было осуществить синтез CpG-ODN, определить способность синтезированных продуктов повышать иммунологическую эффективность сибиреязвенных антигенов и изучить влияние комплексных препаратов, содержащих CpG-ODN, на органы и ткани иммунизированных животных.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы

В работе использовали следующие штаммы сибиреязвенного микроба: рекомбинантный аспорогенный штамм-продуцент *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp^o- (KM97); вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1; тест-заражающий штамм *B. anthracis* 71/12 (2-я вакцина Ценковского) (Государственная коллекция патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»).

Питательные среды

В качестве питательных сред использовали бульон и агар Хоттингера (производство ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»); при необходимости в среду добавляли канамицин (Sigma, США) до концентрации 25 мкг/мл и триптон (Roerig, Германия) – 20 мг/мл.

Лабораторные животные

Эксперименты проводили на мышах линии BALB/c и аутбредных мышах массой от

18,5±1,5 г, а также морских свинок массой 275±25 г. В работе использовали здоровых животных, полученных из питомника ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (Елшанка, Саратовская область). Биомодели содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды. Все эксперименты на животных проводили в соответствии с Директивой № 010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. «О защите животных, используемых для научных целей».

Выделение и очистка белков рПА и ЕА1

Выделение и очистку рПА и ЕА1 из аспорогенного штамма-продуцента *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp^o- (KM97) проводили по разработанной ранее технологии одновременного получения антигенов, включающей этапы концентрирования, диафильтрации с использованием модулей Vivaflow 200 (30 кДа) (Sartorius, Германия) и двухступенчатой хроматографии в системе BioLogic Duo Flow™ (Bio-Rad, США) с применением Macro Prep 50Q (Bio-Rad) и Sephacryl-HR300 (Bio-Rad) для рПА и гидроксиапатита (Sigma) – для ЕА1 [17]. Электрофоретическое разделение белков проводили в вертикальной камере (Amersham, США). Результаты электрофоретического разделения сканировали с помощью устройства для гель-документирования (Bio-Rad).

Синтез и очистка CpG-ODN

Последовательности CpG-ODN синтезировали в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» по опубликованным последовательностям:

CpG 2006: 5'TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3' [4];

CpG 1555: 5'-GCTAGACGTTAGCGT-3' [18];

CpG 1826: 5'-TCCATGACGTTCCCTGACGTT-3' [19];

non-CpG 2137 (отрицательный контроль): 5'TGCTGCTTTTTGTGCTTTTTGTGCTT-3' [14].

Синтез CpG-ODN осуществляли по протоколу, имеющемуся в блоке управления автоматическим синтезатором ASM-800 («Биоссет», Россия) и в соответствии с инструкцией к данному прибору. В качестве окислителя использовали раствор сульфонирующего реактива 3Н-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксида (Sigma).

Определение концентрации и качества синтезированных CpG

Концентрацию синтезированных CpG рассчитывали при помощи программы «Олиго Кальк» с поправкой на молекулярную массу оли-

гонуклеотида. Качество синтезированных олигонуклеотидов проверяли методом электрофореза в 20%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. В роли лидирующего красителя использовали смесь 0,05%-ного бромфенолового синего (Merck, США) и 0,05%-ного ксиленцианола (Panreac, Испания) в 95%-ном водном растворе формамида (Merck), содержащем 10 мМ гидроксид натрия (AppliChem, Германия). Для окрашивания полос и визуализации результата использовали 0,75%-ный Stains-all (Sigma, США) в 50%-ном водном растворе формамида.

Иммунизация

Иммунизацию лабораторных животных осуществляли подкожно в область внутренней поверхности бедра, однократно или двукратно с интервалом в две недели. Разовую дозу вводили морским свинкам в объеме 0,5 мл, линейным мышам – 0,2 мл.

Определение ЛД₅₀ тест-заражающего штамма

Через 21 день после последней иммунизации всех подвергнутых обработке и контрольных биомоделей заражали тест-штаммом *B. anthracis* 71/12 (2-я вакцина Ценковского), используя четыре последовательные дозы с кратностью $\times 10$. Линейным мышам (интактным и иммунизированным) вводили спорую взвесь тест-штамма (0,2 мл) в дозе от $1 \cdot 10^2$ до $1 \cdot 10^5$ спор. За зараженными линейными мышами наблюдали в течение 10 сут. Павших животных вскрывали, специфичность гибели подтверждали посевом материала из органов трупа на агар Хоттингера и учитывали только животных, павших от специфического процесса. Через 10 сут определяли величину ЛД₅₀ тест-заражающего штамма для иммунизированных и контрольных животных.

Определение титра антител в сыворотке иммунизированных животных с использованием ИФА

Кровь забирали из краевой ушной вены морских свинок в установленные сроки. Пробы от четырех особей каждой группы объединяли в один пул. Титр анти-ПА-антител в сыворотках иммунизированных животных определяли с помощью стандартной методики ИФА. В качестве антигена применяли очищенный рПА в концентрации 30 мкг/мл. Видоспецифический иммуноглобулин, меченный пероксидазой (Sigma), использовали в разведении 1:10000 в соответствии с рекомендацией фирмы-изготовителя. Результаты реакции регистрировали в присутствии АВТС (2,2-азино-бис(3-этилбензтиазолин)-6-сульфоновой кислоты) (Sigma) с помощью прибора Stat-Fax 2100 (Awareness Technology, США) при длине волны 405 нм. Каждый эксперимент по определению титра антител повторяли не менее 3 раз.

Выделение лимфоцитов тимуса и селезенки

Линейных мышей разделяли на группы по шесть животных и иммунизировали тестируемыми препаратами. Контрольную группу животных оставляли интактными. Биомоделей умерщвляли через 4 ч после иммунизации эвтаназией путем цервикальной

дислокации в соответствии с Директивой № 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. «О защите животных, использующихся для научных целей». Лимфоциты выделяли общепринятыми методами [20].

Цитометрическое исследование

Фенотипирование лимфоцитов крови и спленоцитов осуществляли на проточном цитометре CyAn ADP (DacoCytomation, Дания) с использованием моноклональных антител RAT ANTI-MOUS CD4:PE и RAT ANTI-MOUS CD8:FITC (BD Biosciences, США).

Определение аномальной токсичности биопрепаратов в экспериментах *in vivo*

Аномальную токсичность антигенных препаратов оценивали в соответствии с Государственной фармакопеей (ХП, ч. 1., стр. 124). Испытание проводили на 10 белых аутбредных мышах массой $18,5 \pm 1,5$ г и 10 морских свинках массой 275 ± 25 г. В течение 7 сут с периодичностью 1 раз в день проводили осмотр и взвешивание животных.

Гистологические исследования

Исследовали ткани печени, сердца, легких, почек, надпочечников, кожи, тимуса, селезенки, регионарных и отдаленных лимфатических узлов. Гистологический материал фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина («НеваРеагент», Россия). Дальнейшую обработку проводили по стандартной методике [21]; готовые полутонкие срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Merck). Микроскопическое исследование гистологических препаратов и их фотодокументирование выполняли с помощью микроскопа Olympus CX41 (Olympus, Япония) и цифровой камеры VZ-C31S (VideoZavr, Россия) в программе VideoZavr (версия 1.5).

Статистические методы

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с применением стандартных методов: вычисление средней арифметической абсолютных и относительных величин (M), средней ошибки средней арифметической (m) и коэффициента достоверности различия средних (t).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез CpG-ODN осуществляли твердофазным фосфорамидитным способом на автоматическом олигосинтезаторе. Для снижения

вероятности образования фосфодиэфирных примесей стадию окисления проводили до кэпирования. В качестве объектов синтеза были выбраны CpG 2006, CpG 1826 и CpG 1555. Данные последовательности широко используются в качестве адъювантов в доклинических и клинических испытаниях разрабатываемых средств специфической профилактики инфекционных болезней. Мы исходили из преимущества CpG 2006 (7909) в связи с его использованием как адъюванта в составе экспериментальных вакцин, допущенных до клинических исследований. Однако в доклинических испытаниях прослеживается избирательность в выборе CpG-ODN для различных видов биомоделей. Например, для экспериментов на линейных мышах чаще предлагаются CpG 1826 и CpG 1555 [18, 19]. Чтобы оценить корректность результатов, полученных при применении сибирязвенных иммуногенных антигенов с CpG 2006, провели сравнительную оценку иммуностимулирующей активности трех различных CpG-ODN: CpG 2006, CpG 1826 и CpG 1555. В качестве контрольного образца использовали синтезированную по той же оптимизированной методике последовательность non-CpG 2137, не содержащую неметилированный мотив.

Идентичность синтезированных CpG-ODN и качество их очистки подтверждали методом электрофореза в полиакриламидном геле. Четкие полосы соответствующего размера без признаков расщепления свидетельствовали об успешных результатах синтеза (данные не приведены).

Для подтверждения адъювантной активности синтезированных продуктов мышей линии BALB/c иммунизировали подкожно однократно препаратом, содержащим 10 мкг рПА и 20 мкг одного из вариантов CpG-ODN. Биомоделям контрольной группы вводили такую же дозу рПА в сочетании с 20 мкг последовательности non-CpG 2137, не обладающей иммуностимулирующим действием. Для заражения всех групп лабораторных животных (по 5 особей в каждой) использовали тест-штамм *B. anthracis* 71/12 в возрастающих концентрациях спор – от $4 \cdot 10^2$ до $4 \cdot 10^5$. Заражение осуществляли на 21-е сутки после иммунизации.

В результате в контрольной группе биомоделей, иммунизированных рПА с non-CpG 2137, показатель ЛД₅₀ тест-штамма составил $3,1 \cdot 10^3$ (634–15924) спор. При иммунизации рПА с CpG 1826 или CpG 2006 значения ЛД₅₀ были одинаковы и значительно превышали контрольный показатель – $1,2 \cdot 10^5$ (31773–2004749). Наилучший ре-

зультат по ЛД₅₀ оказался у мышей, иммунизированных препаратом с CpG 1555 – более $2,0 \cdot 10^5$ (63396–15924287). Данные о протективной активности препаратов, содержащих рПА и различные варианты CpG-ODN, представлены на рис. 1.

Таким образом, все синтезированные CpG-ODN обладали выраженной адъювантной активностью в экспериментах на мышах линии BALB/c. По сравнению с животными контрольной группы, получившими рПА с non-CpG 2137, значение ЛД₅₀ тест-штамма для биомоделей, иммунизированных рПА с CpG 2006 или CpG 1826, было выше почти в 40 раз. При использовании в эксперименте CpG 1555 значение ЛД₅₀ тест-штамма увеличивалось более чем в 60 раз.

Полученные результаты подтверждают корректность оптимизированного метода синтеза и подлинность получаемых продуктов и свидетельствуют о возможности иммунологической оценки на модели линейных мышей препаратов, содержащих в качестве адъюванта CpG 2006. Важно также, что замена коммерческих CpG-ODN на синтезированные нами олигонуклеотидные последовательности с модифицированной основной цепью приводит к существенному экономическому эффекту.

На следующем этапе изучали способность синтетического адъюванта CpG в сочетании с иммуногенными антигенами обеспечивать развитие напряженного и продолжительного адаптивного иммунитета.

Морских свинок (по шесть особей в группе) иммунизировали двукратно с интервалом в две недели рПА (25 мкг) с синтезированным

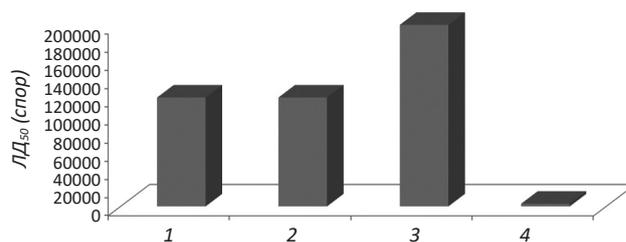


Рис. 1. Сравнение протективной активности (значений ЛД₅₀ тест-штамма) в отношении мышей линии BALB/c препаратов, содержащих рПА и различные варианты CpG-ODN: 1 – рПА + CpG 2006; 2 – рПА + CpG 1826; 3 – рПА + CpG 1555; 4 – рПА + non-CpG 2137

Fig.1. Comparison of protective activity (test strain LD₅₀) for BALB/c mice of preparations containing rPA in combination with various CpG-ODN: (1), rPA + CpG 2006; (2), rPA + CpG 1826; (3), rPA + CpG 1555; and (4), rPA + non-CpG 2137

СрG 2006 (100 мкг). Животным группы сравнения вводили по той же схеме рПА (25 мкг), сорбированный на альгидрогеле. Забор крови из ушной вены осуществляли на 14-е сутки и через месяц после второй иммунизации, а далее с интервалом в 1 мес. Сыворотки животных в каждой группе объединяли в один пул. Результаты твердофазного иммуноферментного анализа представлены на рис. 2.

Из рис. 2 видно, что в сыворотках морских свинок, иммунизированных сорбированным на альгидрогеле рПА, в первые два месяца происходило плавное увеличение количества специфических антител – с 1:1 500 до 1:3 000, а затем к 3-му месяцу наблюдался резкий скачок до максимального значения – 1:32 000 с последующим постепенным уменьшением до 1:8 000 к 6-му месяцу. Однако по напряженности антителогенеза преимущество было на стороне препарата, содержащего в качестве адъюванта СрG 2006. Титр анти-ПА-антител был высоким уже на 14-е сут после второй иммунизации (1:4 000), плавно достигая значения 1:16 000 к 4-му месяцу. Через 6 мес, когда в первом случае намечался спад интенсивности образования антител, у биомоделей, иммунизированных рПА с СрG 2006, происходило увеличение показателя до 1:24 000. Далее значения оставались на том же высоком уровне в течение еще 2 мес.

В наших предыдущих исследованиях были получены результаты, подтверждающие способность СрG-ODN повышать экспрессию структур врожденного иммунитета (TLR) на иммунокомпетентных клетках иммунизированных животных. Было установлено, что рПА и ЕА1 увеличивают экспрессию генов TLR 2 и 6 типов [16]; в дополнение к этому СрG-ODN стимулируют экспрессию генов TLR 9 типа.

В рамках данного исследования мы определяли способность антигенного препарата, содержащего

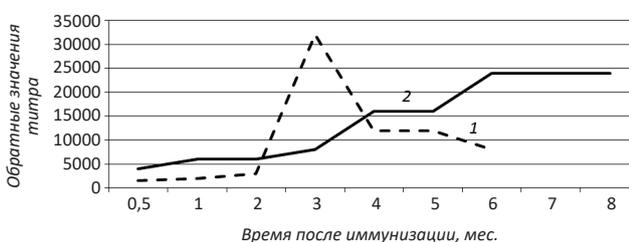


Рис. 2. Динамика титра антител в сыворотках морских свинок, иммунизированных рПА в сочетании с альгидрогелем (1) и синтезированным адъювантом СрG 2006 (2)

Fig. 2. Dynamics of antibody titers in sera of guinea pigs immunized by rPA in combination with alhydrogel (1) or synthesized adjuvant of CpG 2006 (2)

жащего СрG 2006, к активации клеточного звена иммунитета. Уровень маркеров клеточно-опосредованного иммунитета (CD4+, CD8+) в крови и спленоцитах определяли методом импульсной проточной цитометрии. Мышей линии BALB/c иммунизировали подкожно двукратно с интервалом 14 сут разрабатываемым прототипом рекомбинантной сибиреязвенной вакцины, включающим синтезированный СрG 2006. Иммунизирующая доза прототипа вакцины для мыши (1/5 человекодозы) заключала 10 мкг рПА, 5 мкг ЕА1 и 20 мкг СрG 2006 в объеме 0,2 см³. Результаты сравнивали с показателями клеточного иммунитета при иммунизации подобным антигенным препаратом, но с другим адъювантом – альгидрогелем (240 мкг на дозу). Кроме того, в качестве группы сравнения использовали линейных мышей, иммунизированных подкожно однократно споровой взвесью вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 в дозе 2·10⁶ спор. Мышей в контрольной группе оставляли интактными. Забор крови и спленоцитов осуществляли на 7-е, 14-е и 21-е сутки после окончания иммунизации. Материал от животных в каждой группе (по три особи на группу) объединяли в один пул.

В крови животных, иммунизированных антигенными препаратами, на 7-е сутки после иммунизации значительно увеличивалось количество Т-хелперов. Доля CD4+ лимфоцитов достигала уровня 30,91% для препарата с СрG 2006 и 29,27% – для препарата с альгидрогелем (рис. 3а, I, столбец I). В контрольной группе этот показатель составил 8,06% (см. рис.3а, I, столбец IV). В крови линейных мышей, иммунизированных вакцинным штаммом *B. anthracis* СТИ-1, количество CD4+ клеток было близко к контрольному значению – 7,06% (рис. 3а, I, столбец III).

На 14-е сутки после иммунизации уровень регистрации CD4+ лимфоцитов во всех группах иммунизированных животных становился примерно одинаков: 34,19% – для препарата с СрG 2006, 37,01% – для препарата с альгидрогелем, 36,45% – для вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 (см. рис 3а, 2). Приблизительно такое же соотношение отмечали на 21-е сутки после иммунизации (см. рис. 3а, 3).

В отношении цитотоксических Т-лимфоцитов в крови иммунизированных мышей линии BALB/c отмечали сходную тенденцию. На 7-е сутки доля CD8+ лимфоцитов у животных, иммунизированных антигенными препаратами, была почти в 3 раза выше контрольного показателя (3,74%) и составила 10,99% и 10,65%

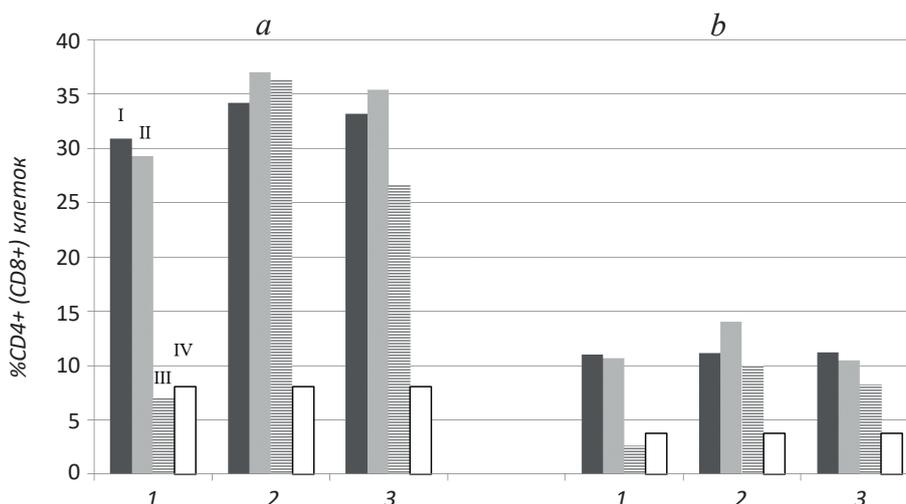


Рис. 3. Уровень маркеров клеточно-опосредованного иммунитета CD4+ (a) и CD8+ (b) в крови мышей на 7-е сутки (1), 14-е сутки (2) и 21-е сутки (3) после иммунизации антигенными препаратами и вакцинным штаммом: I – препарат с CpG 2006; II – препарат с альгидрогелем; III – вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1; IV – в отсутствие иммунизации (контрольная интактная группа)

Fig. 3. Level of markers of cell-mediated immunity CD4+ (a) and CD8+ (b) in mice blood on 7th (1), 14th (2) and 21st (3) day after immunization with antigenic preparations or vaccine strain: (I), CpG 2006-containing preparation; (II), alhydrogel-containing preparation; (III), vaccine strain of *B. anthracis* STI-1; and (IV), without immunization (control intact group)

для препаратов с CpG 2006 и альгидрогелем, соответственно (см. рис. 3b, 1). Самым низким оказалось содержание CD8+ лимфоцитов у животных, иммунизированных вакцинным штаммом *B. anthracis* СТИ-1 – 2,62%. На 14-е сутки уровень регистрации CD8+ клеток в крови иммунизированных мышей всех групп находился примерно на одном уровне: 11,14% – для препарата

с CpG 2006, 14,04% – для препарата с альгидрогелем и 10,12%, – для вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 (см. рис. 3b, 2).

При исследовании спленоцитов показано, что доля Т-хелперов на 7-е сутки после иммунизации составляла 25,26% для прототипа вакцины с CpG 2006, 34,8% – для препарата с альгидрогелем и 28,8% – для вакцинного штамма (рис. 4a, 1).

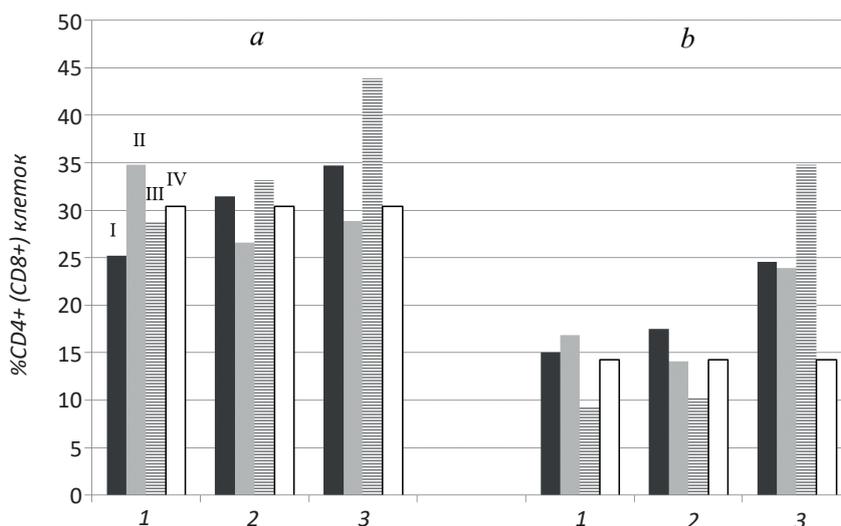


Рис. 4. Уровень маркеров клеточно-опосредованного иммунитета CD4+ (a) и CD8+ (b) в спленоцитах селезенки мышей на 7-е сутки (1), 14-е сутки (2) и 21-е сутки (3) после иммунизации антигенными препаратами и вакцинным штаммом: I – препарат с CpG 2006; II – препарат с альгидрогелем; III – вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1; IV – в отсутствие иммунизации (контрольная интактная группа)

Fig. 4. Level of markers of cell-mediated immunity CD4+ (a) and CD8+ (b) in mice splenocytes on 7th (1), 14th (2) and 21st (3) day after immunization with antigenic preparations or vaccine strain: (I), CpG 2006-containing preparation; (II), alhydrogel-containing preparation; (III), vaccine strain of *B. anthracis* STI-1; and (IV), without immunization (control intact group)

Вместе с тем, показатель в контрольной группе также оказался высоким – 30,4%. Несколько отличное соотношение показателей в трех экспериментальных группах отмечали на 14-е сутки после иммунизации: 31,47%, 26,56 и 33,10% (см. рис. 4а, 2), соответственно, и на 21-е сутки – 34,75%, 28,88 и 43,86% (см. рис. 4а, 3), соответственно. В эти сроки наблюдали небольшую активацию CD4+ спленоцитов мышей, иммунизированных прототипом вакцины с CpG 2006 и вакцинным штаммом *B. anthracis* СТИ-1 (см. рис. 4а, 2 и 3, столбцы I и III), а также снижение относительного количества Т-хелперов в группе животных, иммунизированных препаратом с альгидрогелем (см. рис. 4а, 2 и 3, столбцы II).

Уровень цитотоксических Т-лимфоцитов в селезенке животных, иммунизированных обоими вариантами антигенных препаратов, на 7-е и 14-е сутки (от 14,99 до 17,52%) незначительно превышал контрольный показатель – 14,3% (см. рис. 4б, I и 2). Для животных, иммунизированных вакцинным штаммом, в эти же сроки относительное количество CD8+ спленоцитов было чуть ниже контрольного значения. На 21-е сутки регистрировали более существенное (до 2,5 раз) увеличение содержания Т-киллеров в селезенке животных, иммунизированных вариантами антигенных препаратов – 24,58% и 23,95%; при иммунизации вакцинным штаммом данная величина составила 34,75% (см. рис. 4б, 3).

Полученные результаты свидетельствуют об активации клеточного звена иммунного ответа при иммунизации биомоделей во всех сравниваемых группах. В крови животных, иммунизированных антигенным препаратом, вне зависимости от использованного адъюванта на 7-е сутки наблюдалось повышение приблизительно в 3 раза количества CD4+ и CD8+ лимфоцитов. Значимое увеличение уровня CD4+ и CD8+ клеток в крови у мышей, иммунизированных вакцинным штаммом *B. anthracis* СТИ-1 происходило позже – на 14-е сутки. Однако на протяжении всего исследования отмечали несколько более выраженную иммунную реакцию лимфоцитов крови, чем спленоцитов, на введение антигенных препаратов. В селезенке животных, иммунизированных антигенными препаратами или вакцинным штаммом, количество CD4+ и CD8+ клеток на 7-е и 14-е сутки было на уровне контрольных значений для интактных биомоделей и только на 21-е сутки заметно превысило эти значения. К этому сроку во всех группах достоверно увеличивалось и количество CD8+ клеток, но преимущество в данном случае

было на стороне вакцинного штамма. Важно, что во всех случаях соотношение клеток CD4+/CD8+ было больше 1, что свидетельствует о развитии иммунного ответа по Th1-типу.

На следующем этапе в соответствии с требованиями к иммунобиологическим препаратам изучали безопасность синтезированного адъюванта CpG 2006 в составе прототипа разрабатываемой сибиреязвенной вакцины.

В тесте на аномальную токсичность белым аутбредным мышам вводили внутрибрюшинно 1 человекодозу прототипа вакцины (50 мкг рПА, 25 мкг белка EA1, 0,2 мг CpG 2006), что соответствует пяти дозам, определенным для этого вида лабораторных животных. Морским свинкам вводили подкожно 1 человекодозу, что эквивалентно двум дозам для данной биомодели. В течение 7 сут проводили осмотр и взвешивание. Все животные остались живы, ни у одного не было выявлено видимых признаков интоксикации, масса тела в день окончания наблюдения не уменьшилась по сравнению с исходной, и за время наблюдения был отмечен естественный прирост массы тела и у мышей, и у морских свинок. В месте введения препарата ни у одной биомодели не отмечали изъязвлений, абсцессов, некрозов, выраженного отека окружающей клетчатки и кровоизлияний. Таким образом, даже при превышении в несколько раз иммунизирующих доз препарат не вызывал у животных видимых патологических изменений.

Патоморфологические исследования органов морских свинок, иммунизированных двукратно прототипом вакцины, содержащим синтезированный адъювант CpG 2006, не выявили каких-либо свидетельств повреждающего действия на клетки и ткани макроорганизма. На 7-е сутки после иммунизации в месте введения препарата не было отмечено значимых экссудативно-инfiltrативных изменений. Незначительные изменения в надпочечниках – очаговые участки дезорганизации коркового вещества и умеренное полнокровие сосудов мозгового вещества, укладывались в картину умеренной стресс-реакции органа на введение препарата. Со стороны паренхиматозных органов биомоделей макроскопические изменения не были выявлены. При гистологическом исследовании в миокарде изменений не найдено. В системе гемодинамики печени отмечали умеренные очаговые нарушения; в почках – очаговое умеренное полнокровие сосудов коркового вещества. Признаки умеренного функционального напряжения клеток паренхиматозных

органов укладывались в картину стресс-реакции на введение препарата и не выходили за пределы допустимых значений. Визуальный анализ легких не выявил изменений. При гистологическом исследовании отмечено сохранение воздушности легочной ткани. Регистрируемые незначительные участки полнокровия капиллярной сети обусловлены способом умерщвления животных. В лимфоидных органах при макроскопическом анализе грубых изменений не выявлено. Отмечали небольшое увеличение регионарных и отдаленных лимфоузлов. При гистологическом исследовании регистрировали умеренную гиперплазию фолликулярных структур в лимфатических узлах и начальные признаки клеточной активации. В селезенке наблюдали относительную активацию фолликулярных структур на фоне умеренного полнокровия сосудов красной пульпы.

Следовательно, в ходе изучения морфологических изменений при иммунизации препаратом, содержащим синтезированный адъювант CpG 2006, в целом было продемонстрировано отсутствие его повреждающего эффекта на клетки и ткани макроорганизма. Выявленные при гистологическом исследовании незначительные изменения были обратимыми, укладывались в картину стресс-реакции макроорганизма на вводимый препарат и были расценены нами как допустимые.

Таким образом, нами осуществлен синтез олигодезоксинуклеотидов CpG. В экспериментах на лабораторных животных установлено, что синтезированные продукты обладают выраженной адъювантной активностью. Препараты, содержащие иммуногенные сибиреязвенные антигены и CpG 2006 в качестве адъюванта, индуцируют у экспериментальных животных развитие иммунного ответа с активацией гуморального и клеточного звена иммунитета и не оказывают токсического и повреждающего действия на клетки и ткани макроорганизма. Результаты исследования свидетельствуют о перспективности использования синтезированного адъюванта CpG 2006 в составе прототипов разрабатываемых вакцин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Семенов Б.Ф., Зверев В.В., Хаитов Р.М. Вакцинопрофилактика в XXI веке: настоящее и будущее. Иммунология, 2009, 30(6), 324–335.
2. Bode C., Zhao G., Steinhagen F. et al. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines*. 2011, 10(4), 499–511. doi: 10.1586/erv.10.174
3. Zhu Q., Egelston C., Vivekanandhan A. et al. Toll-like receptor ligands synergize through distinct dendritic cell pathways to induce T cell responses: implications for vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105(42), 16260–16265. doi: 10.1073/pnas.0805325105
4. Vollmer J., Weeratna R., Payette P. et al. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur. J. Immunol.*, 2004, 34(1), 251–262. doi: 10.1002/eji.200324032
5. Gupta K., Cooper C. A review of the role of CpG oligodeoxynucleotides as toll-like receptor 9 agonists in prophylactic and therapeutic vaccine development in infectious diseases. *Drugs R.*, 2008, 9(3), 137–145.
6. Jurk M., Vollmer J. Therapeutic applications of synthetic CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists for immune modulation. *BioDrugs.*, 2007, 21(6), 387–401. doi: 10.2165/00063030-200721060-00006
7. Krieg A. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J. Clin. Invest.*, 2007, 117(5), 1184–1194. doi: 10.1172/JCI31414
8. Dorn A., Kippenberger S. Clinical application of CpG-, non-CpG-, and antisense oligodeoxynucleotides as immunomodulators. *Curr. Opin Mol. Ther.*, 2008, 10(1), 10–20.
9. Burke B., Gómez-Román V., Lian Y., et al. Neutralizing antibody responses to subtype B and C adjuvanted HIV envelope protein vaccination in rabbits. *Virology*, 2009, 387(1), 147–156. doi: 10.1016/j.virol.2009.02.005
10. Пашенков М.В. Иммуномодуляторы на основе мурамилпептидов и бактериальной ДНК: от эксперимента к клинике: дис. ... д-ра мед. наук. ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России Москва, 2013.
11. Rynkiewicz D., Rathkopf M., Sim I. et al. Marked enhancement of the immune response to BioThrax® (Anthrax Vaccine Adsorbed) by the TLR9 agonist CPG 7909 in healthy volunteers. *Vaccine*, 2011, 29, 6313–6320. doi:10.1016/j.vaccine.2011.05.047
12. Minang J., Inglefield J., Harris A. et al. Enhanced early innate and T cell-mediated responses in subjects immunized with Anthrax Vaccine Adsorbed Plus CPG 7909 (AV7909). *Vaccine*, 2014, 32(50), 6847–54. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.01.096.
13. Ali R., Naqvi R., Kumar S. et al. Multiple antigen peptide containing B and T cell epitopes of F1 antigen of *Yersinia pestis* showed enhanced Th1 immune response in murine model. *Scand. J. Immunol.*, 2013, 77(5), 361–71. doi: 10.1111/sji.12042
14. Amemiya K., Meyers J., Rogers T. et al. CpG oligodeoxynucleotides augment the murine immune response to the *Yersinia pestis* F1-V vaccine in bubonic and pneumonic models of plague. *Vaccine*, 2009, 27, 2220–2229. doi:10.1016/j.vaccine.2009.02.016
15. Hickey A., Lin J., Kummer L. et al. Intranasal prophylaxis with CpG oligodeoxynucleotide can protect against *Yersinia pestis* infection. *Infect Immun.* 2013, 81(6), 2123–32. doi: 10.1128/IAI.00316-13

16. Микшис Н. И., Семакова А. П., Попова П. Ю. и др. Перспективность использования различных адъювантов в сочетании с рекомбинантным протективным антигеном сибиреязвенного микроба. Биотехнология, 2014, 6, 36–42.
17. Микшис Н.И., Гончарова А.Ю., Попова П.Ю., и др. Способ получения протективного антигена и белка S-слоя EA1 из аспорогенного рекомбинантного штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1Spo. Патент РФ, 2492241, С12Р21/00; А61К39/02; С12N1/21; С12R1/07. 2012.
18. Tross D. Effect of CpG oligonucleotides on vaccine-induced B cell memory. *J. Immunol.*, 2008, 181(8), 5785–5790.
19. Mikszta J., Sullivan V., Dean C. et al. Protective immunization against inhalational anthrax: a comparison of minimally invasive delivery platforms. *J. Infect Dis.*, 2005, 191(2), 278–288. doi: 10.1086/426865
20. Клаус Дж. Лимфоциты. Методы. М.: Мир, 1990. 5–395.
21. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. М.: СпецЛит., 2010, 3–96.

Immunological Efficiency and Safety of Synthesized CpG Oligodeoxynucleotides

O.M. KUDRIAVTSEVA*, A.P. SEMAKOVA, N.I. MIKSHIS, P.Yu. POPOVA, V.A. KOZHEVNIKOV, A.V. STEPANOV, and S.A. BUGORKOVA

The Russian Research Antiplague Institute Microbe, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, 410005, Saratov Russia

e-mail: rusrapi@microbe.ru, kudrjavceva3074@gmail.com**

Received October 20, 2017

Accepted December 06, 2017

Abstract—The technology for the synthesis is described and the assessment of adjuvant properties of CpG oligodeoxynucleotides is represented. The CpG-ODN sequences were generated after the available sequences on automatic synthesizer. The adjuvant activity was evaluated using CpG-ODN in combination with the recombinant protective antigen and EA1, an S-layer protein of the anthrax agent. It was established that the application of the synthesized adjuvant CpG 2006 along with immunogenic antigens leads to the development of the long-term high-level immunity in test animals. An advantage of the synthetic CpG 2006 preparation over alhydrogel in terms of adjuvant activity was demonstrated. Experiments on biomodels provided the data confirming the absence of toxic and damaging effects of CpG-ODN on the cells and tissues of the macroorganism. The comparison of the cell-mediated immunity (content of CD4+ and CD8+) after the immunization by the *B. anthracis* STI-1 strain or recombinant anthrax vaccine prototype with CpG 2006 or alhydrogel as an adjuvant testifies to the activation of the cellular component of immune system in all the compared groups.

Key words: adjuvants, *Bacillus anthracis*, recombinant protective antigen, anthrax vaccine, anthrax, CpG-ODN.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-1-35-44