

ПЕРВЫЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ СИМПОЗИУМ «НАНОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ИММУНОЛОГИИ»

АДЬОВАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ПРИМЕРЕ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА ЧУМНОГО МИКРОБА

Киреев М.Н., Гусева Н.П., Полунина Т.А.,
Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Шарапова Н.А.,
Тараненко Т.М.

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия

Как известно, капсульный антиген Ф1 является основным иммуногеном возбудителя чумы и компонентом химической чумной вакцины и поэтому изучение различных способов повышения его иммуногенности актуально и перспективно.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния наночастиц коллоидного серебра (КС) на иммунобиологические свойства антигена Ф1 чумного микроба и возможности использования его в качестве адьюванта для стимуляции антителиобразования. Оценку изменений функционального состояния клеток иммунной системы проводили патогистологическим и цитофлуориметрическим методами.

Материалы и методы. В качестве антигена в эксперименте использовали и капсульный антиген Ф1 вакцинного штамма *Yersinia pestis EV* линии НИИЭГ (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»), выделенного из центрифугата бульонной культуры методом одноэтапной гель-хроматографии на АсА-22 в соответствии с «Инструкцией по изготовлению и контролю капсульного антигена Ф1 чумного очищенного, сухого». Препарат Ф1 (сер. 44) представлял собой чистый белок, гомогенный по данным ВЭЖХ и иммунодиффузии.

Для изучения воздействия КС как адьюванта использовали группы беспородных белых мышей, по 24 особи в группе (контрольные: интактные и инъекцированные стерильным физиологическим 0,14 М раствором NaCl (ФР); иммунизированные: антигеном Ф1, золев КС, конъюгатом Ф1 + КС). Мышей иммунизировали однократно, вводя подкожно по 0,2 мл каждого препарата, забор крови проводили на 1, 3, 7, 14, 21, 31 и 45 сутки. Кровь собирали в стерильные пробирки для получения сыворотки и в пробирки, обработанные гепарином, для проведения цитофлуориметрических исследований.

В те же сроки для гистологического исследования забирали материал из паховых и забрюшинных лимфоузлов, селезенки, печени, почек, кишечника, легких и сердца. Образцы помещали в 10% водный нейтральный раствор формалина, дальнейшую их обработку проводили по общепринятой схеме. Полутонкие парафиновые срезы окрашивали растворами гематоксилина и эозина.

Динамику образования специфических антител в мышечных сыворотках определяли твердофазным иммуно-

ферментным анализом (ТИФА) с использованием антивидового пероксидазного конъюгата.

О функциональном состоянии клеток иммунной системы в цельной крови судили с помощью импульсной цитометрии в потоке на проточном цитофлуориметре типа ICP 22 ФИВЕ (ФРГ), измеряя интенсивность флуоресценции каждой из находящихся в суспензии клеток, окрашенных акридиновым оранжевым.

Результаты. Результаты исследований показали, что антиген конъюгированный с золев серебра, для белых мышей обладает высокой иммуногенной активностью. Специфические антитела в сыворотках начали определяться уже на 7 сутки, причем при иммунизации одной Ф1 титр АТ нарастал постепенно, достигая максимума на 14-е сутки, с дальнейшим выходом на более низкий стационарный уровень. Введение мышам конъюгата Ф1 + КС вызвало резкий подъем образования АТ на 7-е сутки, который оставался на высоком уровне до конца наблюдения. В группе контрольных животных и при иммунизации мышей свободным золев серебра иммунологической перестройки не обнаружено.

При патогистологическом исследовании материала от лабораторных животных грубых изменений во внутренних органах и в месте введения препарата, свидетельствующих о резком токсическом действии, не обнаружено. В печени и почках регистрировали незначительное полнокровие сосудов и умеренное функциональное напряжение паренхиматозных элементов.

В результате исследований иммунологической перестройки в организме лабораторных животных установлено, что наночастицы серебра, конъюгированные с Ф1 чумного микроба, обладают выраженным иммуногенным действием. Они способны вызывать активацию генетического аппарата клеток иммунной системы (по данным проточной цитофлуориметрии), сопутствующую выработку специфических антител. Растворы конъюгатов КС с антигеном стабильны, не вызывают общих и местных реакций, экономичны, удобны в применении, что дает возможность их эффективного использования в иммунологической практике в качестве адьювантов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Новикова С.А., Глазова Н.В., Макогонов А.М.

Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург, Россия

Производство ферментных препаратов является одним из перспективных направлений современной биотехнологии. Ферментные препараты широко используются

в медицине, косметологии и др. Гидролитические ферменты имеют ряд особенностей, выгодно отличающих их от других видов сырья: высокая эффективность в микроколичествах, высокая специфичность, быстрое достижение желаемого результата, возможность создания на их основе продукта с заданными свойствами. Однако, расширение номенклатуры новых лекарственных форм, включающих ферменты, затруднено ввиду их высокой лабильности, а также инактивации ферментов за счет взаимодействия с компонентами лекарственных форм. Все это не позволяет выдерживать срок хранения лекарственной формы, требуемый в Фармакопее РФ (2-3 года). Современные достижения нанотехнологии позволяют использовать такие наноматериалы, которые могут не только устранить негативное воздействие сопутствующих компонентов, но и стабилизировать сами ферменты.

Целью данной работы являлось изучение стабильности ферментов в новых лекарственных формах, включающих наноносители.

В качестве наноматериалов были выбраны липосомы и гликосомы производства фирмы «Simrise». В работе были использованы панкреатические ферменты, производимые ООО «Самсон-Мед» (химопсин, рибонуклеаза, дезоксирибонуклеаза).

Методы исследования. Определение активности и концентрации ферментов проводили согласно ФС. Для определения активности ферментов в готовой лекарственной форме был разработан модифицированный метод.

На первом этапе исследовали влияние различных компонентов лекарственной формы и наноносителей на активность ферментов. При этом было показано, что сами наноносители не инактивируют ферменты, а компоненты среды могут значительно снижать их активность. Методом кинетики диффузии через пористые мембраны была рассчитана степень связывания ферментов с нанобъектами, подобраны оптимальные соотношения для каждого фермента. После чего была исследована стабильность ферментов в готовой лекарственной форме. Показано, несмотря на то что при создании готовой лекарственной формы, включающей наноноситель, может наблюдаться некоторая потеря активности введенного фермента, однако в течение всего срока наблюдения (1,5 года) активность оставалась неизменной.

Таким образом, результаты работы доказывают несомненную перспективность использования наноматериалов в исследуемых нами различных лекарственных формах (свечи, салфетки, гели, мази).

НАНОРАЗМЕРНЫЕ УГЛЕРОДНЫЕ ЧАСТИЦЫ В ИММУНОАНАЛИТИКЕ СРЕПТОКОККОВ ГРУППЫ А И АНТИТЕЛ К НИМ

Раев М.Б.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия

Стрептококки группы А (СГА) относятся к наиболее частым возбудителям, вызывающим широкий спектр заболеваний, таких как стрептококковые инфекции дыхательных путей, тонзиллиты, фарингиты, их осложнения — шейные лимфадениты, перитонзиллярные и заглоточные абсцессы, синуситы, мастоидиты, пневмонии и т.д.

До сих пор подавляющее число врачей назначают антибиотикотерапию до получения результатов лабораторного анализа, т.е. основываясь только на результатах осмотра. Это является вынужденным решением, так как определяется отсутствием в повседневной диагностической практике мобильных систем упрощенной диагностики стрептококков группы А. Вместе с тем все чаще появляются случаи молниеносного (до 48 часов) протекания болезни с летальным исходом от синдрома токсического шока при инфицировании СГА. Все это заставляет серьезно оценить необходимость создания экспресс-диагностикумов, которые могут быть равнозначно применены как непосредственно в кабинете врача «on situ testing», так и при проведении предварительного анализа у постели больного или самим больным «in home testing».

Сконструированы модели аналитических систем для определения стрептококков группы А (СГА) и антител к ним. Разработанные диагностикумы не зависят от аппаратного обеспечения. Основой для реализации представляемой разработки является оригинальный конъюгат (диагностический реагент), синтезируемый на основе ковалентного связывания поликлональных антител к стрептококкам группы А с наноразмерными частицами коллоидного углерода. Благодаря высокой оптической плотности таких конъюгатов в видимой области светового спектра, возможно непосредственное визуальное определение СГА в исследуемом образце. Реакция проявляется в виде черных пятен (дотов) на рабочей поверхности твердой фазы. Система может быть аранжирована в виде прямого определения, либо в варианте сэндвич-анализа.

В конструировании систем неинструментального определения антител к СГА использовали конъюгат углеродных наночастиц с G белком.

Об эффективности разработанных тест-систем можно судить по их привлекательным аналитическим характеристикам. Чувствительность детекции СГА по определению группоспецифического полисахарида составила 30-40 нг/мл, по анализу клеточного лизата — 10^4 кл/мл. Антитела к СГА определяли с чувствительностью 0,38 нг/мл.

Такие системы анализа могут стать эффективным инструментом для амбулаторного, госпитального и догоспитального тестирования, включая экстремальные клинические и эпидемические ситуации, а также применяться в различных наборах для домашней и полевой диагностики.

Представленные в нашей работе модели аналитических систем определения СГА в общих чертах характеризуют уровень готовности к реальному производству тест-систем, основанных на применении в качестве детектирующих реагентов конъюгатов углеродных наночастиц.

ИММУНОГЕННОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА НА ОСНОВЕ НАНОЭМУЛЬСИИ-АДЪЮВАНТА

Чепурнов А., Tarek Hamouda, Nicholas Mank, Jessica Knowlton, Tatiana Chepurnova, Andrzej Mys, Joyce Sutcliffe and James R. Baker, Jr.

*НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия
University of Michigan, Michigan, USA*

Вводно-масляная эмульсия с мицеллами наноразмера, разработанная в институте нанобиотехнологии

Мичиганского университета исследована в качестве адъюванта для интраназальной иммунизации против вируса гриппа. В качестве антигена использован вирус гриппа H1N1, штамм Пуэрто-Рико, как субъединичный, обработанный β -пропиолактоном, так и цельновирионный, инактивированный собственно наноэмульсией. Иммунизация посредством закапывания в нос смеси наноэмульсии и антигена в обоих случаях привела к развитию системного и слизистого иммунного ответа. В реакции подавления гемагглютинации титры, формирующиеся в ответ на иммунизацию препаратом на основе цельновирионного антигена, в 40-280 раз превосходили β -пропиолактон инактивированный. Тем не менее вакцинация обоими препаратами защищала от заражения летальной дозой гомологичного штамма. Интраназальная адъювантная вакцина вызывала хорошую реакцию слизистого иммунитета с высоким уровнем иммуноглобулина А, десонстрируя в сравнении с инъекционной формой хороший местный иммунитет. Сильный клеточный иммунный ответ с увеличением Th-1 и Th-17 создавало сбалансированный иммунитет против клеточной и внеклеточной форм вируса. Оба препарата сохраняли свои иммуногенные свойства при хранении при 40 и 25 °С. Таким образом, интраназальный адъювант на основе наноэмульсии эффективно увеличивает иммуногенность антигена, длительно сохраняет стабильность без охлаждения и может применяться безыгольным методом.

FLUORESCENT LIPOSOMES AND FLUORESCENT AND BIOLUMINESCENT CELLS IN STUDIES OF THE IMMUNE RESPONSE TO PARTICULATE ANTIGENS AND TUMORS

Leserman L., Buferne M., Machy P., Serre K., Henri S., M'Home Soudja S. and Schmitt-Verhulst A.-M.

Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, France
Université de la Méditerranée, France

Until recently, the dynamic cellular events necessary for the response of the immune system to infectious agents or malignant transformation could not be observed, but only inferred by their consequences. These include the production of antibody and the initiation of T lymphocyte-mediated immunity. The development of fluorescent particles such as liposomes enabled the uptake of antigen by dendritic cells and its presentation to T cells to be observed more directly using fluorescence techniques. Dynamic methods to detect changes in fluorescence levels for a given cell population permit the rate of antigen uptake and also the extent of division of responding cells to be measured.

The above determinations can only be made *ex vivo*. More recently, the development of whole body bioluminescence and fluorescence measurements, have permitted the analysis of infectious processes and tumor growth *in vivo*. The use of monoclonal responding cells from T cell antigen-receptor transgenic mice permits the response to these events to be followed in real time. Among other possibilities, these systems can be used to study conditions affecting the ability of T cells to recognize tumor antigen and enter tumors. In particular, tumor antigen-specific T cells infiltrate tumors expressing the

relevant antigen when the tumor cells are transplanted into mice. Nevertheless, using a tumor model in which melanomas expressing the same antigen may be induced in mice, we have shown that these T cells may not infiltrate the primary tumor. This result, if it can be generalized, suggests that studies using transplanted tumors need to be interpreted with caution, since their introduction does not reproduce the immunosuppressive environment in which primary tumors are initiated. We will review some studies using model systems in the laboratory to illustrate these methods and results.

SOFT TRIGGERABLE NANOPARTICLES: A FLEXIBLE PLATFORM FOR FUNCTIONAL NUCLEIC ACID DELIVERY *IN VIVO*

Miller A.D.

Imperial College Genetic Therapies Centre, Department of Chemistry, Flowers Building, Armstrong Road, Imperial College London, London, UK

The quest for safe, efficient synthetic non-viral vectors to mediated efficient, functional delivery of nucleic acids has been proceeding for at least 15 years since the first non-viral proof of concept experiments for Cystic Fibrosis (CF) were carried out in transgenic mice models of this monogenic disorder. In our own work towards this objective, we recently described the concept of the synthetic, self-assembly ABCD nanoparticle as a structural paradigm that defines critical requirements for functional and successful non-viral vector mediated nucleic acid delivery *in vivo*. ABCD nanoparticles comprise a nucleic acid such as small interfering RNA (siRNA) or plasmid DNA (pDNA) (A-component) condensed into AB core nanoparticles by means of cationic liposomes (B-component). Core nanoparticles are then coated by post-modification (or surface post coupling) to include various amounts of a stealth/biocompatibility polymer (such as polyethylene glycol, PEG) (C-component) that confers colloidal stability to core nanoparticles *in vivo*. Biological ligands (D-component) may be similarly introduced thereafter to assist functional delivery by receptor-mediated uptake into target cells. Here we describe the realization of three different ABC nanoparticle systems:

siRNA-ABC nanoparticle system for the functional delivery of siRNA to murine liver

pDNA-ABC nanoparticle system for the functional delivery of pDNA to murine lung

siRNA-ABC nanoparticle system for the functional delivery of siRNA to metastatic tumours in a murine model of metastatic cancer. The development of this technology was preceded by the development of multi-modal imaging Gd-ABC nanoparticles for the multi-modal imaging of tumour tissue *in vivo*.

Our conclusion is that we have developed successfully a number of important new and clearly very different synthetic non-viral nanoparticle systems that could be of real utility in the therapy of lung and liver disorders, and even of cancers. The next question to address will be the utility of the ABCD nanoparticle concept for the design of DNA vaccination nanoparticles. The current approaches that we are investigating, in collaboration

with Jaroslav Turánek's laboratory in the Czech Republic, will be described.

- Nanobubble platform for ultrasound-mediated imaging and therapy of solid tumors
- Natalya Rapoport¹, Kwon-Ho Nam¹, Jill Shea², Courtney Scaife²
- Department of Bioengineering, University of Utah, salt lake City, Utah, USA
- Department of General Surgery, University of Utah, salt lake City, Utah, USA

It is known that chemotherapy, radiation therapy, and surgical procedures may significantly suppress lymphocyte-mediated immune response. In contrast in clinical studies, systemic antitumor cellular immunity was shown to be increased after tumor treatment by High Intensity Focused Ultrasound (HIFU) [Wu et al., *Ultrasound Med Biol.* 2004 Sep;30(9):1217-22]. In a different set of studies that involved murine B16-F10 melanoma model, metastasis rates in the amputated tumor-bearing legs were comparable immediately after HIFU treatment (18.8% and 12.5% for HIFU-treatment and no HIFU treatment respectively); however when the amputation was delayed for 2 days, the corresponding metastasis rates were 6.7% and 40%, respectively [Xing et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Oct 31;375(4):645-50]. These results suggest that HIFU treatment can elicit an anti-tumor immune response. In our recent study, we used gemcitabine-refractory human pancreatic cancer model in immunocompromised nu/nu mice. Mice were treated by combining paclitaxel encapsulated in polymeric micelles or nanoemulsion droplets with tumor irradiation by therapeutic ultrasound. A significant tumor regression, suppression of ascites formation, and dramatic decrease of metastasizing were observed in ultrasound treated groups. As long as in athymic mice, stimulation of a cell-mediated immunity is not expected, the possible mechanisms involved in suppression of tumor metastasizing by ultrasound-mediated chemotherapy will be discussed.

LIPOSOME-BASED NANOSTRUCTURES FOR CONSTRUCTION OF RECOMBINANT VACCINES AND IMMUNOTHERAPEUTICS

Jaroslav Turánek

Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Liposomes represent the oldest and the most explored nano-systems for biological studies on model membranes and for medical applications. Liposomes have more than 40 year history and were found as suitable delivery systems for application ranging from cosmetics and dermatology, further including anti-infection and anticancer therapy and diagnostics up to the human as well as veterinary vaccines. Liposomal vaccines have been around for about 30 years and number of liposome variants have been developed, some with evident immune-stimulating properties and an attractive safety profile which resulted in registered products on the market or preparations in advanced stages of clinical testing.

Liposomes represent almost ideal carrier system for the preparation of synthetic vaccines due to their biodegradability

and versatility as regards the incorporation of various molecules having different physical-chemical properties (the size of the molecule, hydrophilicity or hydrophobicity, the electric charge). The molecules and antigens can be either sterically entrapped into the liposomes (the internal aqueous space), or embedded into the lipid membrane (e.g. membrane-associated proteins/antigens) by hydrophobic interactions. Further, they can be attached to either the external or the internal membrane by electrostatic, covalent or metallo-chelating interactions. It is possible to encapsulate simultaneously various compounds into the liposomes: hydrophilised/lipophilised adjuvants (e.g. MPL A, CpG oligonucleotides, MDP and its analogues, recombinant cytokines, LPS, etc.), soluble or membrane protein antigens, ligands for the targeting to the specific receptors on the antigen-presenting cells, coating by the mucoadhesive biopolymers, and surface-charge modifications (e.g., by cationic lipids). We have designed and synthesized new types of non-pyrogenic lipophilic MDP analogues (covered by patents) with changes in both the sugar and the peptide parts of the molecule that demonstrated stimulation of innate antimicrobial immunity in various animal models (mouse, goat, guinea pig, swine) and are suitable for construction liposomal-based recombinant and genetic vaccines. These immunomodulators were used as adjuvants for preparation of new type of recombinant vaccines. Construction and physical-chemical structure of self-assembling liposomal recombinant vaccines will be presented and discussed together with examples from *in vitro* and *in vivo* studies.

Please, send file to my e-mail and imdays@spbraaci.ru.

HIGH CONTENT IMAGING AND ANALYSIS (HCA) APPROACH FOR CHARACTERISATION OF CELL RESPONSES TO NANOMATERIALS

Yuri Volkov

Department of Clinical Medicine, Trinity College Dublin, Ireland

Rapid development of nanotechnology consistently increases the likelihood of human contact with environmentally presented and engineered nanomaterials, i.e. the tiny objects ranging in size from one to several hundreds of nanometres and featuring an extreme diversity in shapes and physico-chemical properties (inorganic silica, carbon, metal oxide, inert metal nanoparticles and core/shell structures, polymeric particles and spheres, nanorods, nanotubes, nanowires, dendrimers, liposomes and complex derivatives of all the above, to name but a few). Phagocytes, epithelium in the lungs and gastrointestinal tract as well as cells of the cardiovascular system are the primary candidates to encounter these nanomaterials in real life situations. Such encounters may cause specific functional responses, including triggering of the intracellular signaling cascades and immune reactions, apoptotic and direct toxic effects. However, there is still very little definitive systematic information about the consequences of interactions of nano-scale objects with human cells and tissues of diverse origin and therefore safety-related issues are high on the agenda in the emerging scientific area of nanomedicine. On the other hand, optimistic expectations are associated with the opportunities

of using the nanoparticles as a new class of drug delivery systems, arising from the fact that the finite, but tunable size of the engineered nanostructures used as drug delivery vehicles can impose very precise nano-scale drug distribution barriers at the level of cells, tissues and entire organism thereby eliminating undesirable side effects pertinent to most contemporary medicines. High content imaging and analysis (HCA) approach provides a unique integrated technological toolkit for visualization and physical characterization of nanoparticle-cell interactions. An exceptional aspect of this approach is that it is possible to identify individual cell, as well

as population responses associated with nanoparticle exposure, as in this way subtle effects on small groups of cells within the whole, which could be averaged out by only screening the whole set, are fully registered and elucidated. We provide here an overview of HCA application scenarios for screening the safety and intracellular distribution of nanomaterials with promising biomedical application potential in live human phagocytes and cells of non-phagocytic origin.

Supported by the Health Research Board of Ireland, Science Foundation of Ireland SRC BioNanoInteract and EU FP-6 Consortium NanoInteract.