

Н.М.Зубавичене, В.В.Золин, Е.А.Ставский**ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ И СУСПЕНЗИОННЫЕ ФОРМЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРОТИВ ЛИХОРАДКИ ЭБОЛА КАК НОВЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ***ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово*

В статье приведены результаты исследования терапевтической эффективности липосомального и суспензионного иммуноглобулинов, приготовленных на основе 10 % козьего иммуноглобулина против лихорадки Эбола. Установлено, что наибольший лечебно-профилактический эффект при экспериментальной лихорадке Эбола на морских свинках был достигнут при двукратном введении суспензионного иммуноглобулина против лихорадки Эбола. Отмечено увеличение инкубационного периода в 2 раза, 37,5 % инфицированных животных выжило. Полученные результаты делают перспективной дальнейшую разработку новых иммуноглобулиновых препаратов различных классов на основе липосом и наноземульсий.

Ключевые слова: лихорадка Эбола, специфический иммуноглобулин, экспериментальная инфекция, морские свинки, липосомы, наноземульсия.

N.M.Zubavichene, V.V.Zolin, E.A.Stavsky**Liposomal and Suspension Forms of Immunoglobulins Against Ebola Fever as the New Medical Preparations***State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*

Presented are the results of investigation of therapeutic effectiveness of liposomal and suspension forms of immunoglobulins, prepared on the basis of 10 % goat immunoglobulin against Ebola fever. The most pronounced therapeutic and preventive effect on guinea pigs with experimental Ebola fever was achieved by double administration of suspended immunoglobulin against Ebola fever. The incubation period increased twofold, 37,5 % of infected animals survived. The results achieved are perspective for further development of new immunoglobulin preparations on the basis of liposomes and nanoemulsions.

Key words: Ebola fever, specific immunoglobulin, experimental infection, guinea pigs, liposomes, nanoemulsion.

Расширение ареалов обитания и миграции населения, усиление товарообмена с африканскими странами, контрабандный ввоз в страну экзотических животных, возможность использования возбудителя лихорадки Эбола (особенностью которого являются высокая контагиозность в сочетании с высочайшей летальностью) в качестве потенциального агента биотерроризма делают необходимой разработку эффективных средств профилактики и лечения этого заболевания.

Сведения об успешном применении специфических иммуноглобулинов для лечения лихорадки Эбола у людей в литературе отсутствуют, хотя имеются сообщения о разработке специфических гетерологичных (лошадиных, козьих) иммуноглобулинов [1, 13, 14]. Однако, являясь гетерологичными, эти иммуноглобулины могут обладать рядом побочных нежелательных эффектов [5, 14]. При этом максимальная концентрация иммуноглобулинов в крови достигается в первые 48 ч после введения, а около 50 % введенного препарата остается в мышцах в месте введения и там же разрушается. Одним из перспективных направлений снижения системной токсичности, повышения биодоступности и, как следствие, увеличения терапевтической эффективности лекарств в современной нанобиотехнологии

является создание их липосомальных форм [4, 6, 7]. Липосомы изменяют фармакокинетику лекарственных веществ и вакцинных препаратов, повышая их терапевтическую эффективность, пролонгируют время действия лекарств в организме. Другим современным направлением разработки препаратов с применением нанотехнологий является получение наноземульсий биологически активных веществ на основе водно-масляной наноземульсии в соотношении 80 % жировых компонентов и 20 % воды, в состав которой входят соевое масло, три-н-бутил фосфат и Triton X-100 [12].

Материалы и методы

Иммуноглобулиновые препараты:

- липосомальный иммуноглобулин, приготовленный на основе 10 % козьего иммуноглобулина против лихорадки Эбола с индексом нейтрализации $(2,5 \pm 0,6) \lg \text{ЛД}_{50}$. Липосомы получали модифицированным методом экструзии мультиламеллярных везикул через поликарбонатные мембраны [4]. Эффективность включения белка в липосомы составила 30 %. Стерильность липосом контролировали стандартным методом [3].

- суспензионный иммуноглобулин – смесь, при-

готовленная на основе 10 % козьего иммуноглобулина против лихорадки Эбола с индексом нейтрализации ($2,5 \pm 0,6$) \lg ЛД₅₀ с водно-масляной наноэмульсией в пропорционном соотношении 80 % жировых компонентов и 20 % воды. В состав нано-эмульсии входят соевое масло, три-н-бутил фосфат и Triton X-100.

Вирусные препараты: вирус Эбола, вид Заир, штамм Заир К-5 (ВЭ), вирулентный для морских свинок, получен адаптацией штамма Заир Mayinga вируса Эбола к морским свинкам путем клонирования и последовательных пассажей на морских свинках [10, 11].

Животные: белые морские свинки, свободные от патогенной флоры, массой 250–300 г, 40 голов, полученные из питомника Charles River. Животных содержали на стандартном рационе. Все болезненные процедуры проводили под прикрытием эфирного наркоза. Уход за инфицированными животными и работа с ними осуществлялись в условиях инфекционного вивария с уровнем биобезопасности BSL-4 (работа персонала в защитных костюмах «Антибелок-5») с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Способ инфицирования: животных инфицировали внутрибрюшинно дозой 1,0 мл разведенной вирус-содержащей суспензии (10 % гомогенат печени морских свинок с исходной концентрацией $1 \cdot 10^6$ ЛД₅₀). Доза инфицирования – 30–50 ЛД₅₀.

Способ введения иммуноглобулиновых препаратов: липосомальный иммуноглобулин вводили однократно внутримышечно через 2 ч после инфицирования ВЭ и двукратно внутримышечно через 2 и 24 ч после инфицирования по 0,5 мл. Нано-иммуноглобулин вводили однократно внутримышечно через 2 ч после инфицирования и внутримышечно двукратно через 2 и 72 ч после инфицирования (в конце среднестатистического инкубационного периода) по 0,5 мл. В эксперименте использовали 5 групп животных по 8 голов в каждой.

В течение 21 сут (срок наблюдения) животных ежедневно осматривали, термометрировали, учитывали их гибель. Заболевшими считали морских свинок, у которых ректальная температура превышала 39,5 °С.

Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами [2].

Результаты и обсуждение

В ходе экспериментов установлено, что заболели 100 % инфицированных ВЭ животных (таблица). Помимо температурной реакции у больных животных были отмечены: взъерошенная шерсть, анорексия, адинамия, жидкий стул. Животные были вялыми, мало реагировали на посторонние вмешательства – не пытались уклониться от манипуляций экспериментатора (термометрирование, процедуры прижизненного интракардиального взятия крови).

Однократное введение липосомального иммуноглобулина через 2 ч после инфицирования морских свинок ВЭ увеличило инкубационный период на 3–4 сут по сравнению с контролем. При этом все остальные показатели у зараженных животных (продолжительность инкубационного и лихорадочного периода, средняя продолжительность заболевания) не отличались от контроля. Двукратное введение этого препарата приводило к достоверному увеличению инкубационного периода на 5–6 сут и сдвигу подъема температуры на 9–11-е сутки по сравнению с контрольной группой морских свинок. Продолжительность лихорадочного периода у животных во второй группе не отличалась от контроля. Кроме того, во второй группе отмечено достоверное увеличение средней продолжительности жизни у экспериментальных животных на 2 сут.

При однократном введении инфицированным морским свинкам суспензионного иммуноглобулина наблюдали двуволновое течение инфекции, инкубационный период увеличился на 6–10 сут по сравнению с контролем. При этом выжило 12,5 % животных. При двукратном введении морским свинкам суспензионного иммуноглобулина отмечен наибольший лечебно-профилактический эффект от применения препарата. Произошло достоверное увеличение инкубационного периода (в среднем, в 2 раза по сравнению с контролем). При этом 37,5 % заболевших животных выжило. В контрольной группе инфицированных животных длительность инкубационного периода, лихорадочного состояния и сроков гибели животных (таблица) с момента инфицирования не превысила обычных временных рамок, как было показано нами ранее [10, 11].

Факт удлинения инкубационного периода являет-

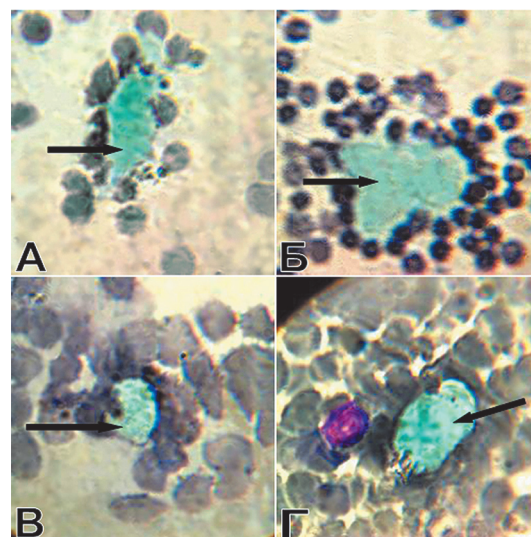
Показатели эффективности применения различных иммуноглобулиновых препаратов при введении инфицированным ВЭ животным

Показатель эффективности	Нелеченные морские свинки (контроль вируса)	Морские свинки, пролеченные разными препаратами иммуноглобулина			
		Липосомальный иммуноглобулин однократно	Липосомальный иммуноглобулин двукратно	Суспензионный иммуноглобулин однократно	Суспензионный иммуноглобулин двукратно
Количество заболевших, %	100	100	100	100	100
Количество выживших, %	0	0	0	12,5 %	37,7 %
Продолжительность инкубационного периода, сут	$3,8 \pm 1,2$	$5,7 \pm 1,4$	$9,7 \pm 0,9$	$10,2 \pm 4,1$	$12,1 \pm 2,4$
Продолжительность лихорадочного состояния, сут	$5,3 \pm 0,5$	$6,5 \pm 1,1$	$5,3 \pm 2,7$	$6,2 \pm 1,3$	$5,5 \pm 0,7$
Средняя продолжительность жизни до гибели, сут	$8,8 \pm 1,7$	$11,0 \pm 1,4$	$12,7 \pm 0,7$	$14,8 \pm 5,8$	$12,8 \pm 3,2$

ся интересным сам по себе. У данной инфекции, как и некоторых других, многими авторами отмечено укорочение инкубационного периода, утяжеление течения заболевания и ускорение гибели экспериментальных животных в случае применения низкотитражных сывороточных препаратов (иммуноглобулинов, гамма-глобулинов), либо низкотитражных гипериммунных сывороток. Следовательно, наши экспериментальные иммуноглобулины нельзя считать малоэффективными. В то же время не удалось получить значительный лечебный эффект при применении липосомального иммуноглобулина. Вероятной причиной может быть неправильно выбранная инфицирующая доза вируса 30–50 ЛД₅₀. Возможно, она была слишком большой. Известно, что эффективность применения лечебных иммуноглобулиновых препаратов ограничена инфицирующей дозой. Экспериментально установлено, лечебно-профилактический эффект от применения специфических иммуноглобулинов на лабораторных животных (морские свинки, приматы) удавалось получить при заражающей дозе 10–20 ЛД₅₀ [7, 9, 13].

Обнадеживающими являются удлинение инкубационного периода и увеличение средней продолжительности жизни, что создает предпосылки для применения других лечебных средств и процедур для борьбы с этим крайне тяжелым заболеванием.

В целом, из практики применения иммуноглобулиновых препаратов можно сделать вывод о получении, скорее, профилактического эффекта (например, при клещевом энцефалите), т.е. в случае успешного применения иммуноглобулинового препарата заболевание не развивается. Такой же эффект мы наблюдали ранее при изучении лечебно-профилактических свойств козьего IgG [5, 14]. Сходные результаты были получены при испытании лошадиного иммуноглобулина против болезни Эбола [8, 13]. В то же время нет упоминания о том, что лабораторные животные были инфицированы, заболели и были вылечены. Во всех ранее опубликованных статьях говорится о том, что инфицированным животным был введен препарат специфического иммуноглобулина через 2–4 ч после инфицирования, животное выжило, при этом у него не развилось заболевание. Тем более интересен полученный нами результат: в группах 3 и 4 инфицированные животные заболели, были пролечены и выжили. Можно предположить, что при введении суспензионного иммуноглобулина через 2 ч и в конце инкубационного периода мы обеспечили более длительное его циркулирование в кровяном русле, что привело к сдерживанию развития инфекционного процесса. Известно, что концентрация введенного лечебно-профилактического иммуноглобулина достигает максимальных значений через 48 ч после введения, после чего препарат начинает быстро разрушаться и выводиться из организма реципиента. Через 7 сут концентрация лечебно-профилактического иммуноглобулина в крови падает в 4–6 раз и через 14 сут определяется в следовых количествах. [5, 14]. Возможно, именно



Липосомы в крови морских свинок, инфицированных ВЭ: верхний ряд – 3-и сутки после введения липосомального иммуноглобулина, нижний ряд – 7-е сутки после введения липосомального иммуноглобулина. А, Б – группа агглютинированных липосом, В, Г – единичные липосомы. Увеличение $\times 1000$. Окраска Азур-II-эозином после обработки мазков парами формалина. Стрелкой показаны липосомы, окруженные эритроцитами

соединение гетерологичного иммуноглобулина с наноземulsion, а также липосомальная форма иммуноглобулина обеспечивают пролонгацию циркуляции иммуноглобулинов в крови, обеспечивая тем самым более длительный лечебно-профилактический эффект. Косвенным подтверждением явления пролонгации может послужить факт, что при анализе мазков крови, полученных у инфицированных животных на 3-и и 7-е сутки с момента введения липосомального иммуноглобулина, видны образования, содержащие белок и имеющие кислую pH (рисунок).

Возможно, что мы наблюдаем липосомы с включенным в них иммуноглобулином. Мазки крови фиксировались формалином, при этом известно, что формалин хорошо сохраняет жиры и липоиды. Окрашивались мазки водными растворами азур-II-эозином (по Нохту), следовательно, липосомы не могли быть растворены спиртом, входящим в некоторые прописи стандартных гематологических красителей. Поэтому, несмотря на определенное воздействие фиксации и окраски, возможно, приведшие к некоему изменению формы, структуры и pH липосом, интересен и необычен сам факт обнаружения структур, похожих на конгломераты липосом, в мазках крови морских свинок в группе, получивших 2 инъекции липосомального иммуноглобулина и отсутствие подобных структур в крови животных из других групп. На всех фотографиях видно, что липосомы обладают аттрактантными свойствами для эритроцитов. Эритроциты образуют вокруг липосом кольца.

Таким образом, наибольший лечебно-профилактический эффект при экспериментальной лихорадке Эбола на морских свинках был достигнут при двукратном введении суспензионного иммуноглобулина

против лихорадки Эбола. Отмечено увеличение инкубационного периода в 2 раза, 37,5 % инфицированных животных выжило. При двукратном введении липосомального препарата иммуноглобулина отмечено достоверное удлинение инкубационного периода в 2 раза по сравнению с нелечеными животными. Полученные нами результаты делают перспективной дальнейшую разработку новых иммуноглобулинов различных классов на основе липосом и наноэмульсий, а также изучение возможностей применения таких препаратов для профилактики и лечения не только геморрагической лихорадки Эбола, но и других особо опасных вирусных инфекций.

Авторы выражают глубокую признательность д-ру James R. Baker, предоставившему нам препараты нано-эмульсии в рамках проекта МНТЦ № 1511, а также Дадаевой А.А. за микроскопию мазков крови, полученных в ходе проведения экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акинфеева Л.А., Аксёнова О.И., Василевич И.В. и др. Случай вирусной геморрагической лихорадки Эбола. Инф. бол. 2005; 1:85–8.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.; 1962; 256 с.
3. Государственная фармакопея. Изд. IX. М.: Медгиз; 1961.
4. Золин В.В., Колокольцов А.А., Агафонова О.А., Бочкова Т.Г. Создание липосомального препарата, содержащего человеческий рекомбинантный альфа-2 интерферон. Вестник РАМН. 1999; 12:18–22.
5. Зубавичене Н.М., Дедкова Л.М., Сергеев Н.Н., Офицеров В.И. Сенсибилизирующие и вируснейтрализующие свойства козьих иммуноглобулинов против вируса Эбола. Вopr. вирусол. 2002; 2:45–8.
6. Каплун А.П., Шон Л.Б., Краснополянский Ю.М., Швеиц В.И. Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ. Вopr. мед. химии. 1999; 45(1):3–2.
7. Краснополянский Ю.М., Степанов А.Е., Швеиц В.И. Некоторые аспекты технологии получения липосомальных форм лекарственных препаратов. Химико-фармацевтический журн. 1999; 33(10):20–3.
8. Краснянский В.П., Михайлов В.В., Борисевич И.В. и др. Получение гипериммунной лошадиной сыворотки к вирусу Эбола. Вopr. вирусол. 1994; 2(40):91–2.
9. Маркин В.А., Михайлов В.В., Краснянский В.П. и др. Разработка принципов экстренной профилактики и лечения лихорадки Эбола. Вopr. вирусол. 1997; 1(42):31–4.

10. Chepurinov A.A., Zubavichene N.M., Dadaeva A.A. Influence of selective passages on the change in Ebola virus properties. Infect. Dis. Rev. 2001; Suppl. 3:30–6.
11. Chepurinov A.A., Zubavichene N.M., Dadaeva A.A. Elaboration of laboratory strains of Ebola virus and study of pathophysiological reactions of animals inoculated with these strains. Acta Trop. 2003; 87(3):321–9.
12. Hamouda T., Hayes M.M., Cao Z. et al. A novel surfactant nanoemulsion with broad-spectrum sporidical activity against *Bacillus* species. J. Infect. Dis. 1999; 180:1939–49.
13. Jahrling P.B., Geisbert J., Swearengen J.R. et al. Passive immunization of Ebola virus-infected Cynomolgus Monkeys with immunoglobulin from hyperimmune horses. Arch. Virol. 1996; Suppl. 11:135–40.
14. Kudoyarova-Zubavichene N.M., Sergeev N.N., Chepurinov A.A. et al. Preparation and use of hyperimmune serum for prophylaxis and therapy of Ebola virus infections. J. Infect. Dis. 1999; 179(Suppl. 1):218–23.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Akinfeeva L.A., Aksenova O.I., Vasilevich I.V. et al. [The case of Ebola haemorrhagic fever]. Inf. Bol. 2005; 1:85–8.
2. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical methods in microbiological investigations]. L.; 1962. 256 p.
3. State Pharmacopeia. Izd. IX. M.: Medgiz; 1961.
4. Zolin V.V., Kolokol'tsov A.A., Agafonova O.A., Bockova T.G. [Development of human liposomal recombinant alpha-2 interferon-containing preparation]. Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk. 1999; 12:18–22.
5. Zubavichene N.M., Dedkova L.M., Sergeev N.N., Ofitserov V.I. [Sensitizing and virus-neutralizing characteristics of goat immunoglobulins to Ebola virus]. Vopr. Virusol. 2002; 2:45–8.
6. Kaplun A.P., Son L.B., Krasnopol'sky Yu.M., Shvets V.I. [Liposomes and other nanoparticles as drug delivery systems]. Vopr. Med. Khimii. 1999; 45(1):3–2.
7. Krasnopol'sky Yu.M., Stepanov A.E., Shvets V.I. [Some technological aspects of liposomal medical preparations production]. Khimiko-Farmatsev. Zhurn. 1999; 33(10):20–3.
8. Krasnyansky V.P., Mikhailov V.V., Borisevich I.V. et al. [Obtaining of hyperimmune horse serum to Ebola virus]. Vopr. Virusolog. 1994; 2(40):91–2.
9. Markin V.A., Mikhailov V.V., Krasnyansky V.P. et al. [Development of principles for emergency prevention and treatment of Ebola fever]. Vopr. Virusol. 1997; 1(42):31–4.

Authors:

Zubavichene N.M., Zolin V.V., Stavsky E.A. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia.

Об авторах:

Зубавичене Н.М., Золин В.В., Ставский Е.А. ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 30.08.10.