

**Степанов А.В., Свиридов Л.П., Добрынин В.М., Левшина Е.В.,  
Старенченко В.В.**

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ РОНКОЛЕЙКИНА В КАЧЕСТВЕ АДЪЮВАНТА ВАКЦИН**

*В монографии обобщены современные данные о вакцинопрофилактике и вакцинотерапии патологических состояний различной этиологии.*

*Подробно рассмотрены вопросы повышения иммунологической эффективности вакцин с помощью адъювантов.*

*Изложена характеристика цитокинов и обоснована целесообразность их включения в состав иммунизирующих препаратов в качестве адъювантов.*

*Проанализированы итоги и определены перспективы применения интерлейкина-2 и его рекомбинантных препаратов в вакцинологии.*

*Книга предназначена для врачей-практиков (эпидемиологов, инфекционистов, онкологов, гематологов, фтизиатров и врачей других специальностей) и научных сотрудников, работающих в вакцинологии.*

**Санкт-Петербург  
2006**

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

ГЛАВА 1. ВАКЦИНЫ И ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ ИХ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ

ГЛАВА 2. АДЪЮВАНТНЫЕ СОЙСТВА ЦИТОКИНОВ

ГЛАВА 3. ПРИМЕНЕНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 В КАЧЕСТВЕ АДЪЮВАНТА ВАКЦИН

ГЛАВА 4. ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ РОНКОЛЕЙКИНА В КАЧЕСТВЕ АДЪЮВАНТА ВАКЦИН

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ЛИТЕРАТУРА

## **Предисловие**

*Вакцинные препараты являются эффективными средствами специфической профилактики и терапии заболеваний как инфекционной, так и неинфекционной природы. Применительно к последним вакцины зарекомендовали себя с положительной стороны в терапии онкологических и гематологических заболеваний.*

*Современная вакцинология характеризуется не только широким использованием уже созданных препаратов, но и интенсивными исследованиями в области разработки вакцин нового поколения (рекомбинантных вакцин, ДНК-вакцин, аутологичных вакцин и др.).*

*Несмотря на значительные успехи в области разработки вакцинных препаратов, эффективность многих из них недостаточна. Поэтому одним из направлений современной вакцинологии является поиск эффективных средств с адъювантными свойствами для повышения их иммуногенности. При этом нельзя не отметить, что все чаще в качестве адъювантов вакцин используют иммуномодуляторы с избирательным действием на различные компоненты иммунной системы. Подобное действие адъювантов в настоящее время рассматривается как основная составляющая поиска эффективных средств повышения иммуногенности вакцинных препаратов, либо включения этих средств во вновь разрабатываемые вакцины.*

*Как в России, так и за рубежом с этих позиций интенсивно изучаются эндогенные иммуномодуляторы – цитокины. Следует, однако, отметить, что, хотя в зарубежной литературе имеются монографии, посвященные использованию цитокинов в качестве адъювантов вакцин, в отечественной литературе исключительно мало материала по этой проблеме и представленная книга, в определенной степени, восполняет этот недостаток. В издании обсуждаются современные данные о вакцинопрофилактике и вакцинотерапии патологических состояний различной этиологии, дается характеристика основных иммунотропных эффектов вакцинных препаратов. Теоретически обосновывается, результатами экспериментальных исследований подтверждается целесообразность включений цитокинов в иммунизирующие препараты в качестве адъювантов. Подводятся итоги и определяются перспективы применения IL-2 и его рекомбинантных препаратов для повышения эффективности специфической профилактики и терапии патологических состояний различной этиологии.*

*Описанные на современном уровне информационные источники об использовании вакцин в профилактических и лечебных целях, применяемые для повышения иммуногенности этих препаратов адъюванты, в значительной степени облегчают всем желающим возможность получения различной информации по обсуждаемой проблеме.*

*Помимо врачей-практиков и научных сотрудников, книга будет полезна молодым врачам и студентам старших курсов, для которых независимо от*

*выбранной ими специальности, проблема специфической профилактики и терапии различных заболеваний весьма актуальна.*

*Член-корреспондент РАМН  
Профессор Ю.В.Лобзин*

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АДС – анатоксин дифтерийно-столбнячный  
АОК – антителообразующие клетки  
БТВ – вакцина брюшнотифозная  
БЦЖ – вакцина туберкулезная  
ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа  
ГПК - глобулин-продуцирующие клетки  
ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота  
ИБП - иммунобиологический препарат  
ИФН – интерферон  
КСФ – колониестимулирующий фактор (Г – гранулоцитарный, М – макрофагальный)  
ЛПС – липополисахарид  
МП - миелопептид  
ФНО – фактор некроза опухолей  
ХВ - вакцина холерная  
ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты  
ТФР – трансформирующий фактор роста  
Ig - иммуноглобулин  
IL - интерлейкин

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что наиболее действенным средством специфической профилактики инфекционных заболеваний различной этиологии являются вакцины. Эти иммунобиологические препараты (ИБП) используются в основном для:

- контроля за инфекционными заболеваниями бактериальной, вирусной и паразитарной этиологии;

- создания устойчивости макроорганизма к инфекциям.

Помимо этого, вакцинные препараты в последние годы применяются в:

- лечении рецидивов хронических воспалительных заболеваний;

- профилактике и лечении аллергозов;

- терапии и профилактике аутоиммунных болезней;

- устранении феномена отторжения трансплантата, возникающего при пересадке органов.

Широкое применение вакцин в медицинской практике обусловлено тем, что они, как антигенные раздражители, вызывают в организме различные по характеру и интенсивности реакции, затрагивающие все его системы. При этом, иммуногенные свойства вакцинных препаратов обусловлены не только их способностью индуцировать синтез специфических антител, но и активировать факторы неспецифической резистентности, а также систему макрофагов и Т-клетки.

Необходимо все же отметить, что иммуногенность ряда вакцинных препаратов недостаточна, в результате чего они не обеспечивают формирование достаточно напряженного иммунитета при профилактическом введении или не дают желаемого терапевтического эффекта при применении с лечебной целью. Эти обстоятельства побуждают к проведению работ по поиску эффективных средств повышения иммуногенности вакцинных препаратов.

В качестве таких средств используют иммуностимулирующие препараты (иммунологические адьюванты) – вещества, неспецифически усиливающие иммунный ответ. К их числу относят соединения, концентрирующие антиген в месте его введения и обеспечивающие тем самым его более интенсивный захват макрофагами (сорбирующая белки  $Al(OH)_3$ , различные масла), некоторые виды бактерий (БЦЖ, коклюшная палочка, липополисахариды грамотрицательных бактерий и др.), синтетические полимеры (полинуклеотиды, полианионы, поликатионы, полиамфолиты).

Достижения иммунофармакологии последних лет позволяют по-новому подойти к этой проблеме. В частности, известно, что при совместном применении с вакцинными препаратами адьюванты по-разному влияют на компоненты и этапы иммунного ответа (макрофаги, В-, Т-клетки и их субпопуляции, естественные киллеры, процессы миграции и кооперации и др.). Это создает прин-

ципиальную возможность дифференцированного применения адъювантов, ориентированного на конкретные клетки-мишени. Селективная модуляция тех или иных звеньев иммунитета адъювантами при их введении с вакцинами для повышения иммуногенности последних может оказаться весьма перспективным направлением вакцинологии. С этой целью можно использовать препараты эндогенных медиаторов иммуногенеза (интерфероны, интерлейкины и др.), которые обеспечивают сбалансированность, специфичность и эффективность иммунных реакций организма на антигенное воздействие.

В книге представлен результат анализа и обсуждения данных отечественной и зарубежной литературы, а также результаты собственных исследований, касающиеся проблемы повышения иммуногенности вакцин посредством их сочетанного применения с IL-2 и его отечественным рекомбинантным аналогом - препаратом Ронколейкин. Излагаются различные точки зрения о перспективности использования в качестве иммунологических адъювантов вакцин цитокиновых препаратов.

## ГЛАВА 1

### ВАКЦИНЫ И ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ ИХ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ

#### 1.1 Вакцины как средство иммунопрофилактики

Средства и методы иммунопрофилактики имеют широкую сферу применения. Их используют в борьбе с инфекционными заболеваниями, аутоиммунными и аллергическими болезнями, для предотвращения развития иммунодефицитных состояний, при трансплантации органов, в онкологии. При этом наибольший исторический опыт и успешное применение иммунопрофилактики связаны с вакцинацией. Применение вакцин базируются на особенностях и закономерностях развития и реализации приобретённого иммунитета и определяются, прежде всего, наличием иммунологической специфичности и памяти. Благодаря клеткам памяти сохраняется программа, обеспечивающая специфическую иммунную защиту от последующих заражений тем же возбудителем. При повторной встрече с антигеном вторичный ответ развивается быстрее и оказывается более эффективным, чем первичный, защитные иммунные механизмы формируются за значительно более короткий срок, чем время, необходимое для размножения микроорганизма и оказания патогенного действия.

Вакцины относятся к наиболее распространённым и широко применяющимся иммунобиологическим препаратам, они содержат антигенный материал и предназначены для профилактики (предупреждения) инфекционных (аллергических, онкологических) заболеваний. Базовым критерием, разрешающим применение вакцин является их безвредность: вакцины не должны вызывать соответствующей патологии или побочных эффектов. И уже при наличии этой характеристики можно выделить основное свойство вакцин, оценивающее их качество, - это эффективность. Последняя предполагает, что вакцины обеспечивают индукцию иммунитета к возбудителям заболеваний (или аллергенам, опухолевым антигенам), и эффект от их применения сохраняется длительное время [7, 8, 14].

Известно, что в состав вакцин входят антиген – активное начало, вещества, активирующие действие антигена, - адьюванты, а также стабилизаторы и консерванты. Очевидно, что эффективность вакцин определяется, прежде всего, свойствами их активного начала и отчасти зависит от особенностей входящего в их состав адьюванта. Имеющиеся типы вакцин существенным образом различаются по природе используемого антигена и способам его получения [7, 8, 14]. К наиболее распространённым в настоящее время относятся вакцины, где антигенами являются естественные возбудители – живые аттенуированные (ослабленные) или убитые (инактивированные).



Аттенуированные штаммы бактерий и вирусов сохраняют антигенные свойства, но характеризуются пониженной вирулентностью. К числу таковых, в частности, относятся вакцины против тифа, холеры, полиомиелита, чумы, кори, эпидемического паратифа, жёлтой лихорадки, коревой краснухи. Наиболее вероятной причиной появления таких «ослабленных» патогенных штаммов могут быть мутации, возникающие при длительном воздействии на возбудитель различных неблагоприятных условий. Эти мутации обеспечивают приспособление к новым условиям среды и плеiotропно влияют на способность размножаться и функционировать в обычных условиях. Как правило, эти вакцины высоко эффективны, но требуют постоянного контроля, так как из-за возникновения обратных мутаций существует опасность возвращения вирулентности к исходному уровню.

В ряде случаев живые вакцины получают, используя в качестве активного начала возбудитель заболевания, специфичный для другого вида, но имеющий общую структуру антигена. Это вакцины на основе так называемых дивергентных штаммов. В частности, оспенную вакцину получают на основе вируса оспы коров, а туберкулёзная вакцина БЦЖ содержит аттенуированный штамм возбудителя туберкулёза крупного рогатого скота. Очевидно, что эффективность этих вакцин определяется степенью сходства антигенной структуры указанных возбудителей и их изменчивостью.

Вакцины, сконструированные на основе убитых штаммов бактерий и вирусов, могут быть использованы при условии сохранения в препарате протективных антигенов и только в тех случаях, когда защита против инфекций основана на образовании антител, поскольку антигены убитых организмов неэффективно презентуются антигенпредставляющими клетками (АПК), и, следовательно, затрудняется индукция цитотоксического эффекта. Эти вакцины безопасны, но менее эффективны, поскольку набор протективных антигенов намного беднее в сравнении с живыми микроорганизмами. По этой причине индуцируется образование антител с ограниченным спектром специфичности. Вакцины данного типа используют, в частности, для профилактики сальмонеллёзов, брюшного и сыпного тифа, чумы, холеры, полиомиелита.

Используемые в повседневной практике вакцины трудно подвергнуть тщательной очистке в силу чего они содержат большое количество балластных компонентов, которые приводят к алергизации прививаемых, возникновению тяжёлых реакций и осложнений. В связи с успехами молекулярной биологии и генной инженерии наметились коренные изменения в способах приготовления вакцин. В настоящее время расшифрован генотип многих вирусных и атогенных возбудителей, охарактеризована структура и выделены гены вирулентности, гены протективного антигена. Эти данные позволяют получать вакцины известной химически охарактеризованной структуры [27].

Изменяя генотип возбудителей путём делеций или точковых мутаций генов вирулентности, направленно конструируют аттенуированные (ослабленные)

штаммы высокой эффективности и безопасные для человека. В частности, таким образом получены вакцины против гриппа [14].

Клонирование генов протективного антигена различных возбудителей открыло возможности для получения рекомбинантных продуцентов вакцин. К числу таковых относятся рекомбинантные штаммы вирусов, бактерий, дрожжей, обеспечивающих экспрессию указанных генов и соответственно синтез антигенов известной структуры. Наиболее удобным для использования в качестве вектора оказался вирус осповакцины. Кроме того, при культивировании рекомбинантных штаммов-продуцентов можно получать достаточные количества определённых протективных антигенов, на основе которых конструируют молекулярные вакцины.

Принцип химической инактивации используют для получения вакцин на основе токсинов, лишённых токсичности, но сохраняющих иммуногенность. Такие химически модифицированные токсины – анатоксины – являются высокоэффективными иммунобиологическими препаратами, применяются в практике для предотвращения заболеваний дифтерией, столбняком, стафилококковых инфекций и др.

В некоторых случаях из-за высокой токсичности антигена для иммунизации используют идиотипические вакцины, содержащие в качестве активного начала антиидиотипические антитела, воспроизводящие конфигурацию антигена. На этом принципе сконструирована эффективная вакцина против вируса гепатита В.

Другой путь создания специфических вакцин известной структуры основан на использовании химически синтезированных пептидов, соответствующих определённым эпитопам антигена. Обычно эти пептиды неиммуногенны, поэтому их конъюгируют с носителями в виде белка или высокомолекулярного полимера. Синтетические вакцины такого типа созданы против сальмонеллёза и гриппа.

Возникновение и развитие генотерапии открыло качественно новый путь иммунопрофилактики, основанный на создании ДНК-вакцин. Методами генной инженерии можно получать любые генетические конструкции, включающие ген протективного антигена. Для переноса и экспрессии цитокиновых генов в качестве вектора используется плазмиды, а также ряд вирусов. При внутримышечном введении вектора в миоциты происходит экспрессия указанного гена, что обеспечивает развитие специфического иммунного ответа. Безопасность метода и возможность целенаправленной иммунопрофилактики открывает большие перспективы применения ДНК-вакцин [52].

И, наконец, необходимо упомянуть о так называемых «терапевтических вакцинах». Это понятие используют для обозначения бактериальных вакцин и анатоксинов, которые индуцируют не только протективный иммунитет, но и вызывают выраженную иммуномодуляцию [12]. Вакциноterapia нашла широкое применение при лечении онкологических больных, устранения рецидивов

хронических заболеваний, а также при купировании проявлений аллергических болезней.

## 1.2 Пути повышения иммуногенности вакцин

Несмотря на многообразие способов получения вакцин остаётся животрепещущей проблема повышения эффективности вакцинации. Пути решения этой проблемы различны. В первую очередь они могут быть связаны с расшифровкой структуры антигена, определением его иммунодоминантных участков и особенностями взаимодействия с клеточными рецепторами [36, 59]. Другая возможность может быть реализована посредством повышения эффективности переработки и подачи антигена антигенпредставляющими клетками, усилением межклеточных взаимодействий за счёт воздействия на клеточные рецепторы и использования костимулирующих молекул [30, 53, 47, 78]. Очевидно также, что эффективность вакцинации непосредственно зависит от активности и сохранности Т- и В-клеток памяти [102]. Кроме того, успехи иммуногенетики человека указывают на необходимость учитывать генетически детерминированную индивидуальность иммунного ответа, что соответственно определяет эффективность вакцинации. В этой связи при конструировании вакцин необходимо учитывать влияние Ig-генов, а также антигенов главного комплекса гистосовместимости [9, 10, 66].

Повышение эффективности вакцинации в настоящее время достигается использованием адъювантов – веществ, усиливающих иммунный ответ при одновременном введении с иммуногеном. Как правило, адъюванты применяют для усиления конкретного иммунного ответа (чаще всего в здоровом организме), а не для нормализации изменённой иммунной реактивности, что служит основным показанием для использования иммуномодуляторов. Спектр соединений, используемых в качестве адъювантов, а также механизмы их действия весьма разнообразны [7, 8, 14].

Реализация действия большинства из них основано на пролонгировании действия антигенов, что обеспечивается созданием так называемого «депо» антигена. Вследствие сорбции антигена на определённых носителях происходит его удерживание в местах, необходимых для экспонирования его антигенпрезентирующим клеткам и лимфоцитам. Такой эффект достигается путём использования как традиционных адъювантов, например, алюминиевых квасцов, так и адъювантов нового поколения – иммуностимулирующих комплексов [14, 61, 93], масляной микроэмульсии [35, 56, 94]. Эффект депонирования достигается также за счёт использования липосом [7, 8, 14].

Усиление иммуногенности вакцин достигается также путём использования адъювантов бактериального происхождения, содержащих микроорганизмы или извлечённые из них субстанции [7, 8, 14, 49]. Индуцируя воспалительный ответ в месте введения, адъювант способствует активации макрофагов. За счёт

усиления фагоцитоза антиген интенсивнее захватывается и перерабатывается фагоцитирующими клетками, что обеспечивает мобилизацию первого этапа защиты против инфекции. К числу адьювантов нового поколения, воздействующих преимущественно на фагоцитарное звено иммунитета, относятся полиэлектролиты, в частности, полиоксидоний. Структурное объединение антигена и полимера-иммуностимулятора стимулирует миграцию фагоцитов, усиливает фагоцитарную активность макрофагов тканей, повышает их переваривающую активность в отношении патогенных микроорганизмов [9, 10]. В то же время адьюванты, созданные на основе молекулярных агрегатов, способны воздействовать на цитокиновый профиль, изменяя его преимущественно по типу Th1 или Th2 [83].

Традиционно используемые адьюванты тем не менее характеризуются рядом недостатков. Адьюванты бактериального происхождения, например, адьювант Фрейнда, даёт многочисленные побочные эффекты. Соединения алюминия, несмотря на широкое применение, тоже могут вызывать аллергические реакции и, кроме того, они эффективны только в отношении тех антигенов, которые требуют индукции гуморального звена иммунитета.

В настоящее время при поиске эффективных средств повышения иммуногенности вакцинных препаратов отдаётся предпочтение адьювантам избирательного целенаправленного действия, и этот поиск значительно расширился в связи с успехами, достигнутыми на пути расшифровки механизмов иммунореактивности. Исследования показали, что все её звенья находятся под контролем цитокинов. Последние синтезируются различными типами клеток, участвующими в развитии иммунного ответа, и характеризуются определённой специфичностью действия [4, 5, 11, 13, 76, 80]. Более того, было подтверждено, что действие традиционных адьювантов на дальнейший ход иммунных процессов также опосредуется определёнными цитокинами. В связи с этим в начале девяностых годов было высказано предположение о возможности использования цитокинов в качестве адьюванта вакцин. Результаты последующих исследований подтвердили, что цитокины играют ключевую роль в регуляции функций практически всех систем организма, что ещё раз подтвердило обоснованность высказанной гипотезы.

В настоящее время многие цитокины существуют в виде рекомбинантных препаратов и являются структурными и функциональными аналогами эндогенных белков. Эта особенность, с одной стороны, снижает вероятность возникновения аллергических реакций при вакцинации и, с другой стороны, позволяет направленно влиять на характер развития иммунного ответа, усиливая в зависимости от природы патогена клеточное или гуморальное звено. Учитывая тот факт, что цитокины рассматриваются как препараты иммунозаместительной терапии, их использование в качестве адьювантов в наибольшей степени целесообразно при вакцинации лиц, страдающих иммунологической недостаточностью, наблюдающейся при старении, после перенесённых заболеваний, стрессо-

вых ситуаций или обладающих наследственно сниженным уровнем иммунореактивности. Не менее актуальна эта проблема и в области создания эффективных препаратов против непобеждённых инфекций, т.е. тех, против которых ещё нет надёжных вакцин. К таковым относятся многие вирусные болезни, включающие СПИД, гепатит С, грипп, инфекционные болезни кишечной группы, венерические болезни, паразитарные инфекции (например, малярия) и т.д. Также разрабатывается подход использования цитокинов в виде адъювантов «терапевтических вакцин», что нашло наиболее широкое применение при онкопатологии [46, 65, 90, 92].

## ГЛАВА 2

### АДЬЮВАНТНЫЕ СВОЙСТВА ЦИТОКИНОВ

Цитокины – растворимые белки, выделяемые моноцитами или лимфоцитами и регулирующие интенсивность воспалительной или иммунной реакции. Цитокины взаимодействуют со специфическими рецепторами на поверхности клеток и могут действовать как аутокринные или паракринные регуляторы. Важнейшие цитокины, их клеточные источники и главные эффекты приведены в табл. 1 [14]. Цитокины можно подразделить на несколько групп: интерфероны (ИФН альфа-, бета-, гамма), факторы некроза опухолей (ФНО альфа- и бета-), интерлейкины (IL-1 - IL-18), трансформирующие факторы роста и кроветворные колониестимулирующие факторы (КСФ). Различные цитокины и их эффекты обычно рассматриваются по отдельности, но важно помнить, что они, так же как и продуцирующие их клетки, в конкретной иммунной реакции действуют одновременно или последовательно, как синергисты или антагонисты. Например, IL-1 способен индуцировать секрецию IL-2; IL-2, IL-4 или IL-6 могут совместно индуцировать размножение цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ); IL-4 и гамма-ИФН противодействуют друг другу при индукции экспрессии гликопротеинов класса II на В-клетках и при индукции секреции IgE.

Таблица 1  
Важнейшие цитокины, их клеточные источники и основные эффекты

Группы цитокинов	Цитокин	Мол. масса, кДа	Источники	Основные эффекты
Интерлейкины (IL)	IL-1 альфа, IL-1 бета	15 - 17	Моноциты, макрофаги	Лихорадка (эндогенный пироген), снотворный эффект, анорексия, воспалительная реакция, экспрессия CD54 эндотелиальными клетками и освобождение ими тканевого фактора, активация лимфоцитов, продукция IL-6 и КСФ
	IL-2	15	Т-клетки (CD4 в большей степени, чем CD8)	Пролиферация Т-клеток, костимуляция размножения и дифференцировки В-клеток, увеличение численно-

				сти натуральных киллеров и киллеров, активированных лимфокинами
	IL-3	14 - 28	Т-клетки	Размножение тучных и полипотентных кроветворных клеток
	IL-4	20	Т-клетки (CD4)	Пролиферация Т-клеток, накопление цитотоксических Т-клеток, костимуляция размножения В-клеток, синергидная с IL-3 стимуляция роста тучных клеток, повышение продукции IgE и IgG1, индукция экспрессии и освобождение CD23, усиление экспрессии антигенов класса II МНС на В-клетках
	IL-5	45	Т-клетки	Дифференцировка эозинофилов, усиление выработки IgA, костимуляция роста В-клеток у мышей
	IL-6	23 - 30	Моноциты, фибробласты, Т-клетки (у мышей)	Пирогенный эффект, индукция роста плазмочитом и гибридом, усиление синтеза иммуноглобулинов, усиление экспрессии антигенов класса I МНС на фибробластах, синергидное с IL-2 усиление продукции белков острой фазы гепатоцитами, синергидная с

	IL-7	25	Клетки стромы костного мозга и тимуса	ИЛ-3 стимуляция роста кроветворных клеток, индукция дифференцировки цитотоксических Т-лимфоцитов
	IL-8	6,5	Моноциты, эндотелиальные клетки, альвеолярные макрофаги, фибробласты	Пролиферация про- и пре-В-клеток, пролиферация незрелых тимоцитов  Хемотаксис и активация нейтрофилов, активация Т-клеток
Интерфероны (ИФН)	ИФН-альфа	18 - 20	Лейкоциты	Подавление репликации вирусов и опухолевого роста, усиление экспрессии антигенов МНС классов I и II, усиление активности натуральных киллеров, модуляция гуморального иммунного ответа
	ИФН-бета	20	Фибробласты	Проявление той же активности, что и у ИФН-альфа
	ИФН-гамма	20 - 25	Т-клетки	Усиление экспрессии антигенов МНС классов I и II, активация макрофагов, усиление активности натуральных киллеров, снижение экспрессии CD23 и



				секреции IgE, индуцированных IL-4, стимуляция роста и дифференцировки В-клеток
Факторы некроза опухолей (ФНО)	ФНО-альфа (кахектин)	17	Моноциты, макрофаги	Индукция выработки IL-1, усиление экспрессии молекул адгезии и антигенов МНС класса I на эндотелиальных клетках, пирогенное действие, индукция выработки ГМ-КСФ, цитотоксический/цитостатический эффект, индукция секреции ИФН-гамма.
	ФНО-бета (лимфотоксин)	25	Т-клетки	Цитотоксический эффект
Колониестимулирующие факторы (КСФ)	Гранулоцитарно-макрофагальный КСФ (ГМ-КСФ)	14 - 35	Т-клетки, макрофаги, моноциты, эндотелиальные клетки	Усиление роста гранулоцитов и эритроидных предшественников, активация макрофагов, стимуляция выработки лейкотриенов эозинофилами и противоопухолевой цитотоксичности макрофагов
	Гранулоцитарный КСФ (Г-КСФ)	18 - 22	Моноциты, фибробласты, эндотелиальные клетки	Усиление роста гранулоцитов
	Макрофагальный КСФ (М-КСФ)	70 - 90	Моноциты, фибробласты, эндотелиальные	Усиление роста моноцитов

			клетки	
Трансформирующие факторы роста (ТФР)	ТФР-альфа	5 - 20	Солидные опухоли (карциномы в большей степени, чем саркомы), моноциты	Ангиогенез, пролиферация кератиноцитов, резорбция кости, опухолевый рост
	ТФР-бета	25	Тромбоциты, плацента, почки, кость, Т- и В-клетки	Пролиферация фибробластов, синтез коллагена и фибронектина, подавление активности цитотоксических Т-лимфоцитов, натуральных киллеров и киллеров, активированных лимфокинами, ингибирование пролиферации Т- и В-клеток, стимуляция заживления ран и ангиогенеза.

Представленные в табл. 1 сведения об эндогенных иммуномодуляторах свидетельствует о том, что они регулируют иммунную реакцию во всех ее звеньях: размножение и дифференцировка предшественников иммунокомпетентных клеток, представление антигена, пролиферация антигенсенсibilизированных лимфоцитов, дифференцировка В-лимфоцитов в продуценты иммуноглобулинов, а Т-лимфоцитов и макрофагов – в цитотоксические клетки. Помимо этого, этим биологически активным веществам принадлежит ключевая роль в индуцировании воспалительной реакции и острофазного ответа организма, элиминации опухолевых клеток, модификации функционального состояния нервной и эндокринной систем. Наличие столь многочисленных эффектов у эндогенных иммуномодуляторов объясняется тем, что рецепторы к ним обнаруживаются на подавляющем большинстве различных типов клеток. Связывание цитокинов с соответствующими рецепторами приводит к экспрессии генов и

последующему синтезу молекул, продуцируемых конкретным типом клеток (табл. 2).

Таблица 2

Экспрессия генов в клетках-мишенях под влиянием цитокинов  
(по Кетлинскому С.А. и соавт., 1992) [4]

Экспрессируемые гены	Клетки-мишени	Цитокины
Иммуноглобулинов	В-лимфоциты	IL-1, -2, -4, -5, -6, ФНО
Антигенов гистосовместимости I и II класса	Т- и В-лимфоциты, эндотелиоциты	IL-1, -2, -4, -5, -6, ФНО
Ростовых факторов, интерлейкинов и их рецепторов	Т- и В-лимфоциты, макрофаги, эндотелиоциты, фибробласты, кератиноциты	IL-1, -2, -5, -8, ФНО, лимфотоксин
Острофазовых белков	Гепатоциты, макрофаги	IL-1, -6, ФНО, лимфотоксин
Факторов комплемента и его рецепторов	Макрофаги, гепатоциты, нейтрофилы	IL-1, -6, -8, ФНО
Клеточных онкогенов	Т-лимфоцитов, ранние предшественники кроветворных клеток	IL-1, -2, -4, -6, ФНО
Факторов свертываемости крови и адгезии	Эндотелиоциты	IL-1, ФНО, лимфотоксин
Коллагенов	Фибробласты	IL-1, -6, ФНО
Адренкортикотропного гормона	Нейроны гипофиза	IL-1, -2, ФНО
Вазопрессина, эндорфина	Нейроны гипофиза	IL-1
АКТГ-рилизинг-фактора	Нейроны гипоталамуса	IL-1

Приведенные в табл. 2 сведения свидетельствуют об участии цитокинов в регуляции функций практически всех систем организма, что еще раз подтверждает необходимость проведения исследований по применению их в качестве адъювантов.

В середине 1990-х годов была предложена гипотеза, согласно которой цитокины могут быть использованы в качестве адъювантов вакцин [41]. Последующими исследованиями данное положение было убедительно доказано. К настоящему моменту в многочисленных исследованиях изучены адъювантные свойства цитокинов: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18,  $\gamma$ -интерферон (IFN- $\gamma$ ), колониестимулирующий фактор - GM-CSF, фактор некроза опухоли (TNF) [44, 48, 51, 53, 78, 91]. Показана различная эффективность стимулирующего действия цитокинов, что, по-видимому, определяется как приро-

дой антигена, так и ролью определённого цитокина в системе иммунорегуляции. Так, на мышах была исследована эффективность ДНК-вакцины против вируса простого герпеса II типа, несущей ген белка HSV-2 gD, при сочетанном введении плазмид с генами различных цитокинов. Модуляторный эффект цитокинов Th1 типа - IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 – проявлялся в ускоренном выздоровлении животных и снижении частоты и серьёзности герпетических поражений при повторном заражении. В то же время цитокины Th2 типа – IL-4 и IL-10 – вызывали повышение заболеваемости и смертности мышей [43]. В настоящий момент к наиболее перспективным можно отнести такие цитокины как интерлейкин-1, -2, -3, -12, -15, IFN- $\gamma$  [72].

**IL-1.** В частности, показано, что IL-1 как адъювант вакцин эффективен против антигенов как белковой, так и углеводной природы. В первом случае требуется участие T-клеточного звена, во втором – развивается независимый от T-клеток иммунный ответ. Соответственно эффективность IL-1 проиллюстрирована при вакцинировании против гепатита В [84] и инфекций, вызываемых стрептококками и пневмококками [22, 70], при повышении иммуногенности гриппозной вакцины [96]. Способ достижения адъювантного эффекта IL-1 связан с активацией T-хелперных и B-лимфоцитов [26, 98]. Следует заметить, однако, что, несмотря на очевидный адъювантный эффект IL-1, его применение требует осторожности из-за наличия пирогенных свойств.

**IL-3.** Адъювантный эффект IL-3 при вакцинации связывают с его модулирующим влиянием на процесс презентации антигена T-хелперным клеткам, что достигается только при условии одновременного введения цитокина и антигена. Причём стимуляция иммунного ответа наблюдается только для T-зависимых антигенов, что не свойственно антигенам полисахаридной природы [55].

**IL-12.** Интересные результаты получены по вакцинации с использованием IL-12 против инфекций, вызываемых простейшими – лейшманией, токсоплазмой [60]. При лейшманиозе исход болезни непосредственно связан с популяционным составом хелперных T-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>: превалирование клеток Th2 приводит к неконтролируемому развитию инфекции и, в конечном счёте, к гибели животных, в то же время изменение соотношения лимфоцитов в сторону Th1 позволяет контролировать темп размножения паразитов, что сопровождается выздоровлением мышей. Как известно, IL-12 образуется макрофагами и дедритными клетками, индуцирует продукцию IFN- $\gamma$  как естественными киллерами, так и T-лимфоцитами. Сочетанное введение антигена и адъюванта IL-12 сопровождается увеличением числа лимфоцитов Th1 и соответственно развитием клеточного звена иммунореактивности. Любопытно, что бактериальные адъюванты, используемые при вакцинировании против лейшманий, также индуцируют синтез IL-12 и аналогичный сдвиг популяционного состава T-лимфоцитов. Детальное изучение профиля цитокинов на разных стадиях инфекционного процесса подтвердило, что наблюдаемые стимулирующие эффекты обусловлены синергидным взаимодействием IL-12 и эндогенного IL-2 [15,

17, 45]. Сочетанное введение рекомбинантного антигена и адьюванта IL-12 при токсоплазмозе приводило к стимуляции синтеза цитокинов Th1-типа и подавлению размножения возбудителя на 40 %. [60]. Также выявлена высокая эффективность IL-12 при изучении его в качестве адьюванта противотуберкулёзной вакцины [61]. Сравнение на мышах адьювантного эффекта цитокинов, синтезируемых лимфоцитами Th1 и Th2, показало, что наибольшее усиление эффективности вирусной ДНК-вакцины против простого герпеса II типа наблюдается при использовании IL-12 [91]. Стимулирующее влияние IL-12 обнаружено и в отношении ВИЧ-1-специфической ДНК-вакцины [74, 88, 104]. Коиммунизация с плазмидой, несущей ген IL-12, приводила к резкому возрастанию антиген-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов [51]. Используется IL-1 также в качестве адьюванта противораковых вакцин [68,77].

**IL-15.** Аналогичный эффект в отношении ДНК-вакцины против ВИЧ-1 показан также для IL-15 [106]. Внутримышечная иммунизация мышей липосомами, содержащими столбнячный анатоксин и IL-15, коррелировала с возрастанием синтеза антистолбнячных иммуноглобулинов -IgG, IgG2, IgG2b [34].

**IFN- $\gamma$ .** Адьювантный эффект IFN- $\gamma$  продемонстрирован для вакцин против малярии в исследованиях на мышах [81]. Его использование способствует повышению экспрессии комплекса гистосовместимости II класса (МНС II) на макрофагах и дендритных клетках. Это усиливает контакт между комплексом МНС-антиген и Т-клеточным рецептором, что в свою очередь приводит к возрастанию пролиферации Т-хелперов I и активизации клеточного звена иммунореактивности [40]. Сочетанное применение IFN- $\gamma$  с вакциной BCG также значительно повышала её иммуногенность [62]. Вакцинация ДНК-вакциной, содержащей ген белка термошока *Yersinia enterocolitica* (Y-Hsp60) и ген IFN- $\gamma$ , сопровождалась повышением содержания иммуноглобулинов IgG и IgG2a, усилением пролиферации Т-клеток [44].

Таким образом, приведенные в настоящей главе данные свидетельствуют в возможности повышения иммунного ответа при введении вакцинных препаратов совместно с цитокинами.

## ГЛАВА 3

### ПРИМЕНЕНИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 В КАЧЕСТВЕ АДЬЮВАНТА ВАКЦИН

В настоящее время в качестве эффективного адьюванта вакцин интенсивно изучается интерлейкин-2. Интерлейкин-2 (IL-2) – один из ключевых компонентов цитокиновой сети, которая обеспечивает межклеточные взаимодействия при реализации иммунореактивности [89]. IL-2 продуцируется CD4-позитивными лимфоцитами: Th0 и Th1 в ответ на антигенную стимуляцию или под влиянием активационного сигнала со стороны ИЛ-1.

IL-2 занимает важное место в иммуногенезе, а его биологическое действие многообразно. IL-2, прежде всего является Т-клеточным ростовым фактором-способствует поддержанию длительного роста Т-лимфоцитов в культуре. Данный цитокин активирует процессы пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов и натуральных киллеров, регулирует экспрессию на цитоплазматических клеточных мембранах рецептора IL-2R и других молекул и рецепторов клеточной адгезии, а также продукцию самого IL-2, гамма-ИФН и других цитокинов [18]. Помимо этого, IL-2 стимулирует пролиферацию В-лимфоцитов, макрофагов, НК-клеток. Секреция IL-2 является необходимым условием для всего дальнейшего хода активации иммунокомпетентных и некоторых других клеток. Кроме митогенного эффекта, IL-2 потенцирует продукцию ряда лимфокинов, клетками-мишенями для которых являются Т-лимфоциты, В-лимфоциты, НК-клетки и макрофаги, причем все эти медиаторы усиливают иммунный ответ за счет функциональной активности указанных клеток. IL-2 стимулирует пролиферацию обоих типов Т-хелперов и только в его присутствии достигается оптимальный уровень пролиферативного ответа лимфоцитов [18].

В этой связи, не случаен тот факт, что использование IL-2 и его рекомбинантных препаратов в медицинской практике рассматривается как одно из наиболее перспективных и постоянно расширяющихся направлений иммунофармакологии. Более того, учитывая оказываемое IL-2 действие на компоненты иммунной системы, можно с уверенностью говорить и о перспективности его использования в качестве адьювантов вакцин. Это положение уже нашло свое отражение в исследованиях отечественных и зарубежных ученых.

Так, Tarasov V.A. и соавт. (1999) изучали эффективность IL-2 в качестве адьюванта аутологичной вакцины, созданной для лечения пациентов с онкологической патологией. Шестьдесят пять пациентов с четвертой стадией рака толстой кишки были подвергнуты комбинированному хирургическому и иммунотерапевтическому лечению, по окончании которого авторы работы сделали следующие заключения:

- хирургическое удаление большой массы опухоли – необходимая предпосылка для эффективного иммунотерапевтического лечения;

- вакцина должна содержать живые опухолевые клетки, адекватно представляющие опухолевые антигены;

- прививка проведенная аутологичными клетками опухоли с использованием БЦЖ-вакцины в качестве адьюванта и IL-2, как иммуностимулятора, эффективно предотвращает метастазирование после успешной операции [100].

IL-2 в качестве адьюванта вакцин также интенсивно используется за рубежом. Maes R. F. (1999) получил положительные результаты при сочетанном применении вакцины БЦЖ с IL-2, который существенно повышал иммуногенность вакцины. По мнению автора, сочетанное применение БЦЖ с IL-2 перспективно для эффективной профилактики и терапии туберкулеза [62].

Применение различных цитокинов – TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$  - сочетанно с инактивированной вирусной вакциной против бешенства показало, что наибольший стимулирующий эффект оказывали IL-2, IFN- $\gamma$ , причём при совместном введении этих цитокинов количество нейтрализующих вирус антител возрастало синергидно [89]. Сходный адьювантный эффект IL-2 зарегистрирован Nunberg (1989) и Perrin (1988) в отношении вакцины против бешенства [73,79]. Повышение иммуногенности вакцины коррелировало с интенсификацией клеточного звена иммунитета [31].

Отчётливый адьювантный эффект низких доз IL-2 продемонстрирован при сочетанном его введении с противогриппозной вакциной: пациенты, получавшие вакцину вместе с IL-2 были более устойчивы к гриппозной инфекции [82]. Положительный стимулирующий эффект IL-2 отмечен в отношении вакцин против ящура, бронхопневмоний и вирусных диарей крупного рогатого скота [64, 71, 85].

Особенно важна проблема создания эффективных вакцин против ВИЧ, где в качестве адьюванта используется IL-2. Varouch D. N. et al. (1998) установили, что для эффективной выработки у мышей иммунного ответа на ДНК-вакцину ВИЧ-1 первоначально животным необходимо вводить специфический антиген, а затем IL-2 [20]. К аналогичному выводу в своих исследованиях пришли Sasaki S. et al. (1998), оценивавшие иммунологическую эффективность ДНК-вакцины ВИЧ-1, примененной в сочетании с IL-2 [88]. при сочетанном введении ДНК-вакцины против ВИЧ I типа и плазмиды с геном IL-2 наблюдали значительное усиление специфического иммунного ответа против ВИЧ-1, что сопровождалось активацией Т-хелперов I типа [107]. Дальнейшее усиление адьювантных свойств IL-2 наблюдали на мышях при испытании конъюгированного белка, полученного путём соединения IL-2 и Fc $\gamma$ 2a района Ig мышей. Сочетанное введение ВИЧ-1-вакцины, кодирующей вирусный гликопротеин gp120 ШВ, и указанного конъюгированного белка приводило к одновременной модуляции многих иммунологических параметров, затрагивающих процессы пролиферации, антителообразования, секреции цитокинов и функционирования цитотоксических лимфоцитов [20]. Модулирование специфического гуморального ответа наблюдали при коиммунизации макак-резус плазмидами, содержащими

гены IL-2, IFN- $\gamma$  или IL-4, и ДНК-вакцины, несущей гены иммунодефицита человека (гены Env и Rev) и обезьян (гены Gag и Pol) [54]. В другом исследовании по изучению вирусов иммунодефицита человека и обезьян показано, что при введении плазмиды с геном IL-2 происходило значительное увеличение пролиферации хелперных Т-лимфоцитов [51].

Anderson G. et al. (1987) было показано, что IL-2 усиливал иммунный ответ свиней на введение вакцины *Haemophilus pleuropneumonia*. Совместное вакцины с IL-2 и дальнейшее введение IL-2 в течение 5 сут приводило уменьшению количества животных с поражениями легких ниже 1 %. В группе животных, которых иммунизировали только вакциной, этот показатель составил 32 %. Более того, протективный эффект вакцинации был больше (поражения легких менее, чем у 1 % животных) если IL-2 вводили многократно, а не однократно (поражения легких у 16 % животных) [16].

Более выраженный иммунный ответ нон-респондентов на иммунизацию вакциной гепатита В наблюдали в случае, когда через один час после вакцинации вводили IL-2 в дозе  $2,5 \times 10^5$  U. При этом образование антител удалось зарегистрировать через 15 нед после иммунизации, а у пациентов, которых иммунизировали только вакциной, иммунного ответа на ее введение не было [24].

Совершенно уникальные возможности открывает использование IL-2 для решения проблемы низкой отвечаемости. Сила иммунного реагирования, как известно, генетически детерминирована, и в человеческой популяции имеются Ir-гены высокого и Ir-гены низкого ответа к определённым антигенам. [9, 10]. Исследования, проведённые с HbsAg вакциной, показали, что неответчаемость на этот антиген коррелирует с МНС-гаплотипом (МНС - главный комплекс гистосовместимости). Сочетанное применение IL-2 способствует преодолению указанной МНС-зависимой низкой отвечаемости на пептидные антигены [24, 33, 50]. Адьювантный эффект IL-2 зарегистрирован также при вакцинации лиц с вторично возникшей иммунной неответчаемостью. Так, клиническое испытание вакцины против гепатита В показало, что IL-2 как адьювант способствует формированию стойкого иммунитета у пациентов с уремией, прежде неспособных к формированию протективного ответа на вакцину [67].

При использовании IL-2 в качестве адьюванта вакцин одной из проблем является очень короткий период полураспада этого цитокина в плазме крови. Поэтому предпринимаются попытки устранить эту проблему путем включения IL-2 в липосомы или микрокапсулы, а также путем введения гена, ответственного за синтез IL-2, в генно-инженерные конструкции при создании рекомбинантных вакцин. Так, на основе вируса осповакцины разработаны противоопухолевые вакцины, в которых в качестве молекулярного адьюванта используют ген, кодирующий IL-2 [23]. Kim J. et al. (2000) изучали способность IL-2 усиливать иммунный ответ у макак-резус на иммунизацию многокомпонентной ДНК-вакциной. Животные были коиммунизированы внутримышечно экспрессирующимися плазмидами со встроенными генами, кодирующие IL-2 и гамма-



ИФН или IL-4, и ДНК-вакциной, сконструированной на основе вируса иммунодефицита, несущего некодирующие элементы Env и Rev, а также гены, кодирующие Gag- и Pol-белки. Наблюдали, что цитокиновые гены, используемые в качестве адъювантов вакцин, особенно IL-2 и IL-4, значительно усиливали иммунный ответ макак-резус [51].

Большие надежды возлагаются на активизацию иммунной защиты от опухолей путём использования противораковых вакцин [1, 3, 42, 43, 58, 75]. Такой подход эффективен в отношении так называемых иммуногенных опухолей, к которым относится, прежде всего, рак почки и меланома, а также рак мочевого пузыря, колоректальный рак, некоторые глиомы головного мозга. В этом случае злокачественные клетки экспрессируют чужеродные для организма-хозяина антигены, на которые может развиваться протективный иммунный ответ. Уничтожение малигнизированных клеток достигается за счёт активации специфических Th1-зависимых цитотоксических клеток. Следует заметить, что указанный иммунологический надзор не эффективен, когда злокачественная опухоль сформировалась и выявляется клинически в связи с подавляющим влиянием опухолевых клеток на иммунную систему организма. Для проведения вакцино-терапии предварительно необходимо хирургическое удаление большой массы опухолевых клеток.

При создании аутологичных вакцин используют опухолевый материал онкологических больных: ткани, клетки или их фрагменты и отдельные белки [19, 37, 57, 86, 95]. В настоящее время иммунотерапевтические вакцины, применяемые при раке почки, меланоме, раке желудка, толстого кишечника, поджелудочной железы и предстательной железы, проходят I и II фазы клинических испытаний [25, 28, 57, 69, 101]. Однако, несмотря на достигнутые успехи, проблема низкой иммуногенности антигенов, ассоциированных с опухолями, остаётся. Пути её решения связаны либо с генетической модификацией клеток опухоли с целью повышения их иммуногенности [32, 103], либо применением адъювантов. В последнем случае наиболее перспективно использование в качестве адъювантов цитокинов: IL-2, IL-12, IFN- $\alpha$ , CSF. В частности, в настоящее время проходит клинические испытания вакцина для лечения метастатической меланомы, в которой в качестве антигена используется модифицированный иммунодоминантный пептид gp100 (меланома-меланоцитдифференцирующий антиген). В качестве адъюванта при создании вакцины использовали IL-2 [19, 28, 38]. По предварительным данным у 38 % больных, которым вводили пептидную вакцину в сочетании с IL-2, произошла регрессия опухоли [99]. Basak S. et al. (2000) исследовали рекомбинантную вакцину на основе гена, кодирующего синтез ассоциированного с опухолью толстой кишки антигена GA733, с IL-2 для лечения колоректального рака в модельных экспериментах на мышах. У животных под влиянием иммунизации происходило значительное ингибирование роста опухоли у мышей [21].

В настоящее время клонирование многих опухолевых антигенов позволило получить вакцины, специфические к определённым антигенам. Так, для стимуляции противоопухолевого иммунного ответа при лечении колоректального рака в модельных экспериментах на мышах Basak S. et al., использовал вакцину к антигену GA733, сконструированную на основе аденовируса. Было показано, что у животных под влиянием иммунизации происходило ингибирование роста опухоли. Использование IL-2 в качестве адьюванта приводило к значительному возрастанию противоопухолевого эффекта [21]. В исследованиях Rosenberg S.A. [86, 87] для иммунизации использован иммунодоминантный пептид gp100 меланомного антигена. Введение его в опухолевые клетки проводили с помощью векторов аденовируса или вируса оспы. У 38% больных, получавших пептидную вакцину и IL-2, наблюдали регрессию опухоли. Использование IL-2 в качестве адьюванта показало, что он более эффективен, чем IL-12 и GM-CSF [87]. Аналогичный эффект был получен Bronte V. et al. (1995) при иммунизации мышей препаратов рекомбинантного IL-2 в сочетании с поксвирусной рекомбинантной вакциной, содержащей опухолеспецифический антиген. В результате применения такой схемы иммунизации иммунологическая эффективность последней заметно возросла [23].

Вакцинация идиотипическими вакцинами разрабатывается для лечения лимфом и миелом с применением в качестве адьювантов IL-2 и GM-CSF [29, 63, 97]. У пациентов с множественной миеломой наблюдали ремиссию заболевания продолжительностью от 9 до 36 месяцев при подкожном введении IL-2 или GM-CSF и идиотипической вакцины [29].

Полученные в последние годы рекомбинантные препараты IL-2 положительно зарекомендовали себя в качестве иммуномодуляторов при профилактике и лечении различных патологических состояний. Проводится активное их изучение и в качестве адьювантов вакцин. Так, Li Wen B. O. et al. (1999) исследовали влияние рекомбинантного IL-2 (пролейкин) на активность ДНК-вакцины против вируса гепатита В. В экспериментах на мышах линии Balb/c авторы показали, что применение в ассоциации с ДНК-вакциной этого препарата значительно повышало ее иммунологическую эффективность как в отношении продукции HBs-антител, так и пролиферации лимфоцитов. Аналогичный эффект наблюдался Bronte V. et al. (1995) при иммунизации мышей пролейкином в сочетании с поксвирусной рекомбинантной вакциной. В результате применения такой схемы иммунизации иммунологическая эффективность последней заметно возросла [23]. Weinberg A. et al. (1988) зарегистрировали усиление иммунного ответа в модельных экспериментах на морских свинках, иммунизированных экстрактами вируса простого герпеса (HSV-2) или рекомбинантным гликопротеином D, выделенным из HSV-2, в сочетании с пролейкином. При этом последний вводили животным подкожно в течение 17 сут после иммунизации в разовой дозе  $5 \times 10^4$  U. У животных, иммунизированных обоими вакцинными препаратами в сочетании с пролейкином, клинические показатели были лучше,

чем у животных, иммунизированных только вакцинами. Более того, отмечена корреляция цитотоксической активности и протективного эффекта вакцин, усиленных пролейкином. Интересными оказались результаты, полученные после повторного заражения этих животных (через 2 мес) HSV-2 вирусом. Защитный эффект составил 75 % [105]. Сходные результаты были получены и Hazama M. et al. (1993), использовавшим для иммунизации рекомбинантную герпетическую вакцину, усиленную рекомбинантным IL-2 [39].

Суммируя вышеприведенные данные, можно заключить, что IL-2 и изученные к настоящему времени в качестве адъювантов его рекомбинантные аналоги, в частности, пролейкин являются достаточно эффективными адъювантами и способствуют повышению эффективности вакцинных препаратов различной природы.

## ГЛАВА 4

### ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ РОНКОЛЕЙКИНА В КАЧЕСТВЕ АДЬЮВАНТА ВАКЦИН

В России также получен рекомбинантный препарат человеческого ИЛ-2 – Ронколейкин® (ООО «Биотех», Санкт-Петербург). Препарат является полным структурным и функциональным аналогом эндогенного ИЛ-2 человека и обладает тем же спектром биологической активности [2, 6]:

- уменьшает уровень апоптоза Т-лимфоцитов;
- подавляет экспрессию первичных рецепторов некоторых патогенов на клетках;
- предотвращает прогрессивное уменьшение численности популяции CD4+-лимфоцитов;
- корректирует субпопуляционный баланс между Th1 и Th2;
- корректирует профиль регуляторных цитокинов;
- увеличивает функциональную активность естественных киллеров;
- увеличивает функциональную активность специфических Т-лимфоцитов киллеров;
- увеличивает продукцию интерферонов;
- активирует эффекторные функции моноцитов/макрофагов;
- повышает экспрессию продуктов МНС I и II классов на различных клетках;
- увеличивает эффективность презентации антигенных детерминант патогенов.

Благодаря своим иммуотропным эффектам Ронколейкин в настоящее время нашел достаточно широкое применение в медицинской практике в качестве иммунокорректора при различных патологических состояниях. Вместе с тем, пока сведения об эффективности этого препарата как адьюванта вакцин отсутствуют. Однако имеющийся на сегодняшний день положительный опыт применения ИЛ-2 и его рекомбинантных препаратов ИЛ-2 в качестве адьювантов вакцин, может свидетельствовать в пользу перспективности использования препарата Ронколейкин® для повышения иммуногенности как существующих вакцинных препаратов, так и при разработке вакцин будущего. Оправданным, по-нашему мнению, представляется использование Ронколейкина® как адьюванта вакцин в случаях проведения иммунизации в эпидемически опасных ситуациях, при встрече с генетически изменёнными штаммами возбудителей инфекций, а также в других случаях повышенного риска возникновения инфекций. Кроме того, весьма оправданным представляется использование этого препарата совместно с вакцинами при иммунизации контингентов, подверженных воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды (радиация – ра-

ботники АЭС, шумы и вибрация – работники авиационной промышленности, заводов по производству железобетонных изделий и др.), поскольку подобные состояния и воздействующие факторы приводят к развитию в организме в той или иной степени выраженности вторичных иммунодефицитных состояний, на коррекцию которых, как раз и направлено, основное действие Ронколейкина®.

Вышеприведенные предположения уже нашли свое логическое подтверждение в ряде проведенных нами экспериментальных исследований по изучению эффективности ряда иммунобиологических препаратов (секстаанатоксин, герпетическая вакцина, живая оспенная вакцина, вакцина венесуэльского энцефаломиелита лошадей) при их сочетанном применении с Ронколейкином®.

#### **4.1. Адьювантные свойства Ронколейкина® в отношении герпетической вакцины**

Исследования выполнены на белых беспородных мышах-самцах массой 16-18 г. Моделирование герпетической инфекции осуществляли путем подкожного введения животным суспензии, содержащей вирус герпеса простого 1 типа в объеме 0,5 мл/мышь, в дозе 2,5 ЛД<sub>50</sub>. Заражение осуществляли на 28 сут после иммунизации. Для снижения резистентности и повышения восприимчивости животных к инфекции их подвергали однократному облучению за 4 сут до заражения на установке ИГУР-1 при мощности дозы 1,5 Гр/мин. Совокупная доза облучения составила 5,5 Гр. Численность животных в опытных и контрольных группах составляла 10 мышей.

Для иммунизации использовали вакцину герпетическую культуральную инактивированную сухую (ГВ) (сер. 26, контр. № 688), выпускаемая Предприятием по производству бактериальных препаратов Санкт-Петербургского НИИ вакцин и сывороток РАО «Биопрепарат» МЗ РФ (Санкт-Петербург). Иммунизирующая доза ВГ составляла 0,1 человеческой дозы. ИБП вводили однократно подкожно в объеме 0,5 мл.

Ронколейкин® вводили животным подкожно в дозе 100 МЕ/мышь по следующим схемам: одновременно с ИБП в одном шприце, одновременно с ИБП в разных шприцах, на фоне иммунизационного процесса - за 3, 2, 1 сут до заражения. Животным контрольных групп вводили: только ИБП, либо только Ронколейкин®, либо физиологический раствор хлорида натрия.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что Ронколейкин® в изученных схемах и дозе обладал определенным адьювантным действием в отношении ВГ только в случае его либо совместно с ВГ за 28 сут до заражения, но в разных шприцах, либо на фоне иммунизационного процесса за 3, 2 и 1 сут до заражения. В этих случаях по сравнению с использованием только ГВ выживаемость инфицированных мышей возрастала на 30 %, а по сравнению с животными, которым не вводили ни Ронколейкин®, ни ВГ, этот показатель увеличился на 70 %.

Нельзя не отметить, что если животным вводили только цитокиновый препарат либо однократно за 28 сут, либо трехкратно за 3, 2 и 1 сут до заражения, то их выживаемость по сравнению с животными контрольных групп возрастала на 10-25 % и 30-45 %, соответственно, то есть протективный эффект Ронколейкин® в отношении экспериментальной герпетической инфекции оказался даже несколько выше, чем создаваемый ИБП.

Специально следует остановиться на результатах, полученных в группе животных, которым Ронколейкин и ВГ вводили в одном шприце за 28 сут до заражения. В этом случае не только не удалось получить сколько-нибудь выраженного повышения выживаемости инфицированных животных по сравнению с применением только рекомбинантного препарата, либо только ВГ, но зарегистрировано резкое снижение устойчивости животных к инфекции (летальность инфицированных животных составила 100 %).

#### 4.2 Адьювантный эффект Ронколейкина® в отношении вакцины венесуэльского энцефаломиелита лошадей

Оценку адьювантных свойств Ронколейкина по отношению к вакцине венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВВЭЛ) проводили в «точечных» экспериментах, в каждой точке использовали по 10 мышей массой от 16 до 18 г. Вирусосодержащий материал вводили животным подкожно в объеме 0,3 мл/мышь. Заражающие дозы вируса составляли 2 и 10 ЛД<sub>50</sub>. Для заражения использовали вирус венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ), патогенный штамм Тринидад. Исходный титр вируса 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> ЛД<sub>50</sub>/мл.

Для иммунизации использовали вакцину венесуэльского энцефаломиелита лошадей культуральную инактивированную жидкую (ВВЭЛ) (сер. 145; контр. N 1244), производства НПО «Вирион» МЗ РФ (Томск). Ронколейкин применяли в дозе 100 МЕ/мышь, вводили подкожно или внутримышечно по различным схемам. ВВЭЛ применяли однократно, вводили внутримышечно в объеме 0,5 мл, иммунизирующая доза ИБП составляла 0,1 человеческой дозы.

Результаты проведенных исследований представлены в табл. 3.

Таблица 3

Защитное действие Ронколейкина и вакцины венесуэльского энцефаломиелита лошадей в отношении экспериментальной инфекции ВЭЛ

Схема применения Ронколейкина относительно ВВЭЛ и заражения	Способ введения Ронколейкина	Заражающая доза возбудителя (количество ЛД <sub>50</sub> )	Выживаемость, М (М-тм-М+тм), %
Одновременно с	Внутримышечно	10,0	15 (2-45)

ВВЭЛ в одном шприце за 21 сут до заражения		2,0	40 (12-74)
Одновременно с ВВЭЛ в разных шприцах за 21 сут до заражения	Подкожно	10,0	40 (12-74)
		2,0	100 (69-100)*
Раздельно с ВВЭЛ за 3, 2, 1 сут до заражения	Подкожно	10,0	40 (12-74)
		2,0	100 (69-100)*
Без ВВЭЛ за 21 сут до заражения	Подкожно	10,0	40 (12-74)
		2,0	70 (35-93)*
Без ВВЭЛ за 3, 2, 1 сут до заражения	Подкожно	10,0	60 (26-83)
		2,0	100 (69-100)*
Не вводили (контроль 1)	-	10,0	15 (2-45)
		2,0	70 (35-93)*
Не вводили (контроль 2)	-	10,0	0 (0-31)
		2,0	15 (2-45)
Контроль 1 – животных иммунизировали только ВВЭЛ; Контроль 2 – ВВЭЛ и Ронколейкин не вводили; * - различия с показателями в контрольных группах достоверны при $P < 0,05$			

Как следует из представленных в табл. 3 данных, ВВЭЛ, введенная однократно за 21 сут до заражения в зависимости от заражающей дозы вируса обеспечивала выживаемость 15 % (10 ЛД<sub>50</sub>) и 70 % (2 ЛД<sub>50</sub>) инфицированных животных. Введение в эти же сроки только Ронколейкина обеспечивало выживаемость 40 % (10 ЛД<sub>50</sub>) и 70 % (2 ЛД<sub>50</sub>) инфицированных вирусом ВЭЛ мышей. Более эффективным оказалось использование Ронколейкина по многократной схеме. При этом в зависимости от заражающей дозы вируса выживаемость инфицированных мышей составила 60-100 %.

При сочетанном применении ВВЭЛ и Ронколейкина в одном шприце величины показателей выживаемости инфицированных животных составили 15-40 % и были либо на уровне, либо несколько меньшими, чем в группах животных, которым вводили только ВВЭЛ или только Ронколейкин. Более эффективным оказалось сочетанное применение ВВЭЛ и Ронколейкина, но в разных шприцах. В этом случае независимо от схемы применения цитокинового препарата и заражающих доз вируса ВЭЛ показатели выживаемости инфицированных животных составили 40-100 %. При этом нельзя не отметить, что эти показатели были на уровне установленных в группах животных, которым вводился Ронколейкин и на 25-30 % превышали величины аналогичных показателей, зарегистрированных в группах животных иммунизированных ВВЭЛ.

### 4.3 Адьювантные свойства Ронколейкина в отношении живой оспенной вакцины

Исследования выполнены на белых беспородных мышах-самцах массой от 10 до 12 г. Численность групп - по 20 животных в каждой.

Для иммунизации использовали вакцину оспенную живую сухую (ВО) (сер. 80, контр. N 1841), производства НПО "Вирион" МЗ РФ (Томск). Препарат вводили животным в дозе 0,2 человеческой дозы, иммунизацию осуществляли однократно подкожно, объем вводимой ВО составлял 0,5 мл.

Ронколейкин применяли в дозе 50 МЕ/мышь, вводили подкожно по различным схемам.

Заражение мышей проводили интраназально через 14 сут после иммунизации. Для этого использовали вирус оспы хищных (ОХ), штамм Пуменок. Исходный титр вируса составлял  $10^3$ - $10^4$  ЛД<sub>50</sub>/мл. Вирусосодержащую суспензию вводили в объеме 0,1 мл. Заражающие дозы вируса составляли 1 и 10 ЛД<sub>50</sub>.

Результаты исследований представлены в табл. 4. Установлено, что независимо от схемы применения Ронколейкина не удалось выявить выраженного адьювантного действия препарата в отношении ВО.

Таблица 4

Защитное действие Ронколейкина и вакцины оспенной в отношении оспы хищных

Схема применения Ронколейкина относительно ВО и заражения	Заражающая доза возбудителя (количество ЛД <sub>50</sub> )	Выживаемость, М (М-tm-M+tm), %
Одновременно с ВО в одном шприце за 14 сут до заражения	10,0	40 (19-64)*
	1,0	60 (36-81)
Одновременно с ВО в разных шприцах за 14 сут до заражения	10,0	60 (36-81)*
	1,0	70 (46-88)
Раздельно с ВО за 3, 2, 1 сут до заражения	10,0	70 (46-88)*
	1,0	70 (46-88)*
Без ВО за 14 сут до заражения	10,0	30 (12-54)
	1,0	90 (68-99)
Без ВО за 3, 2, 1 сут до заражения	10,0	10 (1-32)
	1,0	90 (68-99)
Не вводили (контроль 1)	10,0	60 (36-81)
	1,0	70 (46-88)
Не вводили (контроль 2)	10,0	0 (0-17)
	1,0	50 (27-73)



Контроль 1 – животных иммунизировали только ВО;  
 Контроль 2 – животным не вводили ВО и Ронколейкин;  
 \* - различия достоверны по сравнению с контролем 2 при  $P < 0,05$ .

Величины показателей выживаемости инфицированных животных, которым вводили Ронколейкин и ВО практически не отличались от таковых, зарегистрированных в группах мышей, иммунизированных только вакцину.

#### 4.4 Адьювантный эффект Ронколейкина по отношению к секстаанатоксину

Как известно, секстаанатоксин является полианатоксином, включающим в себя анатоксины против ботулизма типов А, В, Е и раневых клостридиозов (эдематичес, перфрингенс, столбняк). В данном препарате упомянутые анатоксины сорбированы на гидрате окиси алюминия. Для формирования специфической защиты препарат применяется трехкратно, при этом между первой и второй прививками интервал составляет 28-30 сут, а между второй и третьей – 4-6 мес.

Исследования по оценке адьювантных свойств Ронколейкина в отношении секстаанатоксина проводили на белых мышах и морских свинках. Доза Ронколейкина® составляла 400 МЕ/мл.

Иммунизацию осуществляли двукратно с интервалом 30 сут. Ронколейкин и секстаанатоксин вводили в одном шприце подкожно. Объем вводимой смеси препаратов составлял 0,5 мл. В качестве инфекционной модели использовали экспериментальную раневую инфекцию, вызванную *Cl.perfringens* типа А (штамм 233). Моделирование инфекционного процесса осуществляли спустя 14 сут после второй иммунизации путем заражения животных возбудителем совместно с 5 % раствором хлорида кальция. Культуру возбудителя и хлорид кальция вводили внутримышечно в заднюю лапку животных в объеме 0,5 мл. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 5 и 6.

Таблица 5

Защитная эффективность Ронколейкина в комбинации с секстаанатоксином в отношении экспериментальной раневой инфекции, вызванной *Cl.perfringens* типа А, в опытах на белых мышах

Препарат для иммунизации	Кратность иммунизации	Количество животных в группе, гол.	Срок заражения после иммунизации, сут	Заражающая доза возбудителя, ЛД <sub>50</sub>	Выживаемость, М (М+tm-M+tm), %
Секстаанатоксин+Ронколей-	2	20	14	16	100 (83-100)**

кин					
Секстаанатоксин	2	20	14	16	70 (46-88)*
Ронколейкин	2	20	14	16	15 (3-40)
Контроль заражения	-	20	14	16	0 (0-17)
** - различия достоверны по отношению к привитым только секстаанатоксином и контролю при $p < 0,05$ ; * - различия достоверны по отношению к контролю при $p < 0,05$					

Применение одного Ронколейкина® не оказывало существенного положительного влияния на устойчивость животных к заражению *Cl.perfringens* типа А. Выживаемость инфицированных мышей в данной группе составила 15 %. Иммунизация одним секстаанатоксином обеспечивала защиту 70 % инфицированных животных на фоне 100 % летальности в контроле ( $p < 0,05$ ). Наиболее эффективным в данных условиях оказалось сочетанное применение секстаанатоксина и Ронколейкина. В этом случае удалось достигнуть 100 % выживаемости инфицированных мышей на фоне полной летальности в контроле ( $p < 0,05$ ). Более того, этот показатель был достоверно выше, чем в группе животных, привитых только полианатоксином ( $p < 0,05$ ). Аналогичные результаты были получены и в опытах на морских свинках (табл. 6).

Таблица 6

Профилактическая эффективность комбинированного применения секстаанатоксина и Ронколейкина в отношении экспериментальной клостридиальной раневой инфекции, вызванной *Cl.perfringens* типа А, в опытах на морских свинках

Вводимый препарат	Срок введения препарата до заражения, сут.	Количество животных в группе	Величина ЛД <sub>50</sub> (млн. м.кл.* в 1 мл)	Индекс резистентности
Секстаанатоксин + Ронколейкин	7	20	275,00	394,00
Секстаанатоксин	7	20	180,00	260,00
Ронколейкин	7	20	10,79	15,00
Не вводили (контроль)	-	20	0,70	-

Примечание: сорбированный и нативный Ронколейкин® вводили однократно подкожно. Доза Ронколейкина составляла 600 МЕ/мл. \* - м.кл. – микробная клетка.

Как оказалось, в случае введения сорбированного Ронколейкина® величина ЛД<sub>50</sub> возбудителя была примерно в 26 раз выше, чем при применении только Ронколейкина (индекс резистентности соответственно 275,0 и 10,79) и в 1,2 раза выше, чем в случае применения только секстаанатоксина.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о целесообразности применения Ронколейкина для повышения эффективности специфической профилактики инфекционных заболеваний различной природы. В целом, судя по полученным результатам, использование данного цитокинового препарата позволяет повысить эффективность вакцинации на 20-30 %.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вакцинные препараты являются эффективными средствами специфической профилактики и терапии заболеваний как инфекционной, так и неинфекционной природы. Современная вакцинология характеризуется не только широким использованием уже созданных и годами применяемых с положительным эффектом вакцинных препаратов, но и интенсивными исследованиями в области разработки вакцин нового поколения (генно-инженерных, ДНК-вакцин, аутологичных вакцин и др.), а также поиском эффективных средств с адъювантными свойствами для повышения их иммуногенности вакцинных препаратов. Среди последних приоритет отдается иммуностимулирующим препаратам, использование которых для повышения иммунологической эффективности вакцин уже зарекомендовало себя с положительной стороны.

Вместе с тем, необходимо отметить, что все чаще в качестве адъювантов вакцин используют иммуномодуляторы с избирательным действием на те или иные компоненты иммунной системы. Неслучайно, что подобное действие адъювантов рассматривается как основная составляющая поиска эффективных средств повышения иммуногенности вакцинных препаратов, либо включения этих средств во вновь разрабатываемые вакцины.

Как в России, так и за рубежом интенсифицируются исследования по поиску эффективных адъювантов вакцин среди эндогенных иммуномодуляторов – цитокинов. Данный объект выбран неслучайно, поскольку цитокины являются регуляторами иммунной реакции, причем эта регуляция осуществляется ими во всех ее звеньях: размножение и дифференцировка предшественников иммунокомпетентных клеток, презентация антигена, пролиферация антигенсенситивизированных лимфоцитов, дифференцировка В-лимфоцитов в продуценты иммуноглобулинов, а Т-лимфоцитов и макрофагов – в цитотоксические клетки. Помимо этого, цитокинам принадлежит ключевая роль в индуцировании воспалительной реакции и острофазного ответа организма, элиминации опухолевых клеток, модификации функционального состояния нервной и эндокринной систем.

Адъювантными свойствами обладают IL-1, IL-12, ФНО-альфа, ряд КСФ и др. Однако анализ имеющихся к настоящему времени публикаций по рассматриваемой проблеме свидетельствует о том, что наибольшее их число посвящено IL-2. По-видимому, это совершенно оправдано, поскольку IL-2 принадлежит ключевая роль, как регуляторному фактору адекватной иммунореактивности. К тому же получены результаты, обосновывающие целесообразность использования IL-2 в качестве адъюванта ряда противоопухолевых, противотуберкулезных, противогерпетических, противогриппозных вакцин.

Помимо применения в качестве адъюванта нативного IL-2, в последнее время, преимущественно за рубежом, исследуется перспективность аналогичного использования его рекомбинантных препаратов. Уже получены положительные результаты при сочетанном применении таких препаратов с рекомбинантной вакциной гепатита В, рекомбинантной поксвирусной вакциной и рекомбинантной герпетической вакциной.

**В нашей стране разработан и с успехом применяется в медицинской практике рекомбинантный препарат человеческого IL-2 – Ронколейкин, поэтому использование его в качестве адъюванта вакцин может также оказаться весьма перспективным.**

Приоритетными областями применения Ронколейкина в качестве адъюванта вакцин можно считать следующие:

- повышение иммуногенности существующих вакцинных препаратов (при проведении иммунизации в эпидемически опасных ситуациях, при встрече с генетически-измененными штаммами возбудителей инфекций, в других случаях повышенного риска возникновения инфекций);
- иммунизация контингентов, подверженных воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды (радиация – работники АЭС, шумы и вибрация – работники авиационной промышленности, заводов по производству железобетонных изделий и др.);
- повышение эффективности вакцинопрофилактики и вакцинации больных туберкулезом, ВИЧ-инфекцией, хламидийной инфекции, герпетической инфекции, гепатита В;
- повышение эффективности вакцинации больных с онкологической и гематологической патологией;
- разработка рекомбинантных и ДНК-вакцин нового поколения.

Полученные нами результаты уже можно рассматривать в качестве своеобразного обоснования использования Ронколейкина при проведении вакцинопрофилактики таких инфекционных заболеваний, как герпес, венесуэльский энцефаломиелит лошадей, оспенная инфекция, раневые клостридиозы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бережная Н.М. Иммунореабилитация и злокачественный рост: надежда и реальность. // Intern. J. Immunorehabilitation, 1999: №11, с.27-35.
2. Егорова В.Н., Смирнов М.Н. Новые возможности иммунотерапии с использованием Ронколейкина<sup>®</sup> - рекомбинантного интерлейкина-2 человека. // Terra Medica, 1999: № 2, с. 15-17.
3. Кадагидзе З.Г. Современные подходы к иммунотерапии опухолей. // Intern. J. Immunorehabilitation, 1998: №10, с.54-65.
4. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., Воробьев А.А. Эндогенные иммуномодуляторы. // СПб: «Гиппократ», 1992. 256 с.
5. Кетлинский С, А., Калинина Н.М. Иммунология для врача. // СПб: «Гиппократ», 1998. 156 с.
6. Козлов В.К., Лебедев М.Ф., Егорова В.Н. Коррекция дисфункций иммунной системы Ронколейкином<sup>®</sup>. // Terra Medica, 2001: № 2, с. 12-14.
7. Медуницын Н.В. Вакцинология. // М: «Триада», 1999. 279 с.
8. Микробиология и иммунология. Под ред. А.А. Воробьева. // М: «Медицина», 1999. 464 с.
9. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Искусственные антигены и вакцины. // М: «Медицина», 1988. 288 с.
10. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Вакцины нового поколения на основе синтетических полиионов: история создания, феноменология и механизмы действия, внедрение в практику. // Intern. J. Immunorehabilitation, 1999: №11, с.13-25.
11. Семёнов Б.Ф., Варгин В.В. Иммуномодуляция при вирусных инфекциях и вакцинация. // Итоги науки и техники. Серия «Вирусология», 1989.
12. Семёнова И.Б., Семёнов Б.Ф. Закономерности коррекции вторичных иммунодефицитов разными по своей природе иммуномодуляторами. // Intern. J. Immunorehabilitation 1997: № 6, стр. 35-40.
13. Фрейдлин И.С. Иммунная система и её дефекты. // СПб: НТФФ «Полисан», 1998. 112 с.
14. Ярилин А.А. Основы микробиологии. // М: «Медицина», 1999. 607 с.
15. Afonso L.C.C., Scharton T.M., Vietra L.Q., et al. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. // Science 1994: v. 263, p.235-237.
16. Anderson G., Urbano O., Fedorka-Cray P., et al. Intrleukin 2 and protective immunity in *Haemophilus pleuropneumoniae*. Preliminary studies. // In: Vaccines, Cold Spring Harbor Press, 1987, p.22-25.
17. D'Andrea A., Rengaraju M., Valiante N.M., et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. // J. Exp. Med. 1992: v. 176, p.1387-1398.
18. Arroyo P.J., Bash J.A., Wallack M.K. Active specific immunotherapy with vaccinia colon oncolysate enhances the immunomodulatory and antitumor effects on in-

- terleukin-2 and interferon alpha in a murine hepatic metastasis model. // *Cancer Immunol. Immunother.* 1993: v.31, p.305.
19. Barnavon Y., Iwaki H., Bash J.A., Wallack M.K. Treatment with vaccinia colon oncolysates and IL-2 for murine hepatic metastasis. // *J. Surg. Res.* 1988: v.45, p.523.
  20. Barouch D.H., Santra S., Steenbeke T.D., et al. Augmentation and suppression of immune responses to an HIV-1 DNA vaccine by plasmid cytokine/Ig administration. // *J Immunol* 1998: v.161, p.1875-1882.
  21. Basak S., Esk S., Gutzmer R., et al. Colorectal cancer vaccines: antidiotypic antibody, recombinant protein, and viral vector. // *Ann NY Acad Sci* 2000: v.910, p.237-252.
  22. Blecha F., Reddy D.N., Chitko-McKown C.G., et al. Influence of recombinant bovine interleukin-1 and interleukin-2 in pigs vaccinated and challenged with *Streptococcus suis*. // *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1995: v.44, № 3-4, p.329-346.
  23. Bronte V., Tsung K., Rao J.B., et al. IL-2 enhances the function of recombinant poxvirus-based vaccines in the treatment of established pulmonary metastases. // *J Immunol* 1995: v. 154, p.5282-5292.
  24. Chow Y-H., Huang W-L., Chi W-K., et al. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. // *J Virol* 1997: v.71, № 1, p.169-178.
  25. Clary B.M., Coveney E.C., Philip R., et al. Inhibition of established pancreatic cancers following specific active immunotherapy with IL-2 gene transduced tumor cells. // *Cancer Gene Ther.* 1997: v.4, p.97-104.
  26. Dinarello C.A. Interleukin-1. // *FASEB J.* 1988: v.2, p.108-115.
  27. Ertl H.C.J. and Xiang Z. Novel vaccine approaches. // *J Immunol* 1996: v.156, p.3579-3582.
  28. Ewend M.G., Thompson R.C., Anderson R., et al. Intracranial parcrine interleukin-2 therapy stimulates prolonged antitumor immunity that extends outside the central nervous system. // *J Immunother* 2000: v.23, № 4, p.438-448.
  29. Fenton R.G., Steis R.G., Madara K., et al. A phase I randomized study of subcutaneous adjuvant IL-2 in combination with an autologous tumor vaccine in patients with advanced renal cell carcinoma. // *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996: v.19, № 5, p.364-374.
  30. Fleo J., Tisminetzky S., Baralle F. Modulation of the immune response to DNA vaccine by costimulatory molecules. // *Immunology* 2000: v.100, № 2, p.259-267.
  31. Geissler M., Gesien A., Tokushige K., and Wands J.R. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokin-expressing plasmids. // *J. Immunol.* 1997: v.158, p.1231.
  32. Gilboa E. Immunotherapy of cancer with genetically modified tumor vaccines. // *Semin. Oncol.* 1996: v.23, p.101-107.

33. Good M.E., Pombo M.N., Lunde W.L., et al. Recombinant human IL-2 overcomes genetic nonresponsiveness to malaria sporozoite peptides. // *J. Immunol.* 1988: v.141, p.972-977.
34. Gursel M., Gregoriadis G. Interleukin-15 acts as an immunological co-adjuvant for liposomal antigen in vivo. // *Immunol. Lett.* 1997: v.55, № 3, p.161-165.
35. Gursel M., Gregoriadis G. The immunological co-adjuvant action of liposomal interleukin-2: the role of mode of localisation of the cytokine and antigen in the vesicles. // *J. Drug Target* 1998: v.5, № 2, p.93-98.
36. Hackett C.J. Focus on the immunological of effective vaccines // *Immunologist* 1997: v.5, № 5, p.171-174.
37. Hadden J.W. The immunology and immunotherapy of breast cancer // *Int. J. Immunopharmacol.* 1999: v.21, № 2, p.79-101.
38. Harada M., Matsuzaki G., Shinomiya Y., et al. Generation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by combined treatment with inactivated tumor cells and recombinant interleukin-2. // *Cancer Immunol. Immunother.* 1994: v.38, p.332-338.
39. Hazama M., Mayumi-Aono A., Asakawa N., et al. Adjuvant-independent enhanced immune responses to recombinant herpes simplex virus type I glycoprotein D by fusion with biologically active interleukin-2. // *Vaccine* 1993: v.11, p.629-636.
40. Heath A.W., Devey M.E., Brown I.N., et al. Interferon-gamma as an adjuvant in immunocompromised mice. // *Immunology* 1989: v.67, p.520-524.
41. Heath A.W., Playfair J.H.L. Cytocines as immunological adjuvants // *Vaccine* 1992: v.10, p.427-434.
42. Heaton K.M., and Grimm E.A. Cytokine combination in immunotherapy for solid tumors: a review. // *Cancer Immunol. Immunother.* 1993: v.37, p.213.
43. Hoffman D.M., Gitlitz B.J., Bellegram A., Figlin R. A. Adoptive cellular therapy. // *Semin. Oncol.* 2000: V.227, № 2, p.221-233.
44. Hornef M.W., Noll A., Schirmbeck R., Reimann J., Autenrieth I.B. DNA vaccination using coexpression of cytokine genes with a bacterial gene encoding a 60-kDa heat shock protein. // *Med. Microbiol. Immunol.* 2000: v.189, № 2., p.97-104.
45. Hsieh C.S., Macatonia S.E., Tripp C.S., et al. Development of TH1 CD4+ cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. // *Science* 1993: v. 260, p.547-549.
46. Hughes H.P., Campos M., van Drunen Littel-van den Hurk, et al. Multiple administrations with interleukin-2 potentiates antigen specific responses to subunit vaccination with bovine herpesvirus-1 glycoprotein IV. // *Vaccine* 1992: v.10, p.226-230.
47. Iwasaki A., Stiernholm B.J.N., Chan A.K., Berinstrein N.L., and Barber B.H. Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines. // *J. Immunol.* 1997:v.158, p.4591.



48. el Kassas H., Kirkwood J.M. Adjuvant application of interferons. // *Semin. Oncol.* 1996: v.23, № 6, p.737-743.
49. Katz J.M., Lu X., Young S.A., Galphin J.C. Adjuvant activity of the heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli* for oral administration of inactivated influenza virus vaccine. // *J. Infect. Dis.* 1997: v.175, № 2, p.352-363.
50. Kawamura H., Rosenberg S., and Berzofsky J.A. Immunization with antigen and interleukin-2 in vivo overcomes Ir gene low responsiveness. // *J. Exp. Med.* 1985: v.162, p.381-386.
51. Kim J.J., Simbiri K.A., Sin J.I., Dang K., Oh J., Dentchev T., Lee D., Nottingham L.K., Chalian A.A., McCallus D., Ciccarelli R., Agadjanyan M.G., Weiner D.B. Cytokine molecular adjuvants modulate immune responses induced by DNA vaccine constructs for HIV-1 and SIV. // *J. Interferon Cytokine Res.* 1999: v.19, № 1, p.77-84.
52. Kim J.J., Yang J.S., Dentchev T., Dang K., Weiner D.B. Chemokine gene adjuvants can modulate immune responses induced by DNA vaccines. // *J. Interferon Cytokine Res.* 2000: v.20, № 5, p.487-498.
53. Kim J.J., Yang J.S., Montaner L., Lee D.J., Chalian A.A., Weiner D.B. Coimmunization with IFN-gamma or IL-2, but not IL-13, or IL-4 cDNA can enhance Th-1 type DNA vaccine-induced immune responses in vivo. // *J. Interferon Cytokine Res.* 2000: v.20, № 3, p.311-319.
54. Kim J.J., Yang J-S., vanCott T.C., et al. Modulation of antigen-specific humoral responses in rhesus macaques by using cytokine cDNAs as DNA vaccine adjuvants. // *J. Virol.* 2000: v.74, № 7, p.3427-3429.
55. Kimoto M., Kindler V., Higaki M., et al. Recombinant murine IL-3 fails to stimulate T or B lymphopoiesis in vivo, but enhances immune responses to T cell-dependent antigens. // *J. Immunol.* 1988: v.140, p.1889-1894.
56. Krup O.C., Kroll I., Bose G., Falkenberg F.W. Cytokine depot formulations as adjuvants for tumor vaccines. I. Liposome-encapsulated IL-2 as a depot formulation. // *J. Immunother.* 1999: v.22, № 6, p.525.
57. Langer L.J. Autologous vaccines. // *GEN*, 1999: v.19, № 21.
58. Lathe R., Kieny M.P., Gerlinger P., et al. Tumour prevention and rejection with recombinant vaccinia. // *Nature* 1987: v.326, p.878.
59. Lee J.J., Sinha K.A., Harrison J.A., et al. Tetanus toxin fragment C expressed in live *Salmonella* vaccines enhances antibody responses to its fusion partner *Schistosoma haematobium* glutathione S-transferase. // *Infect. Immun.* 2000: v.68, № 5, p.2503-2512.
60. Letscher-Bru V., Villard O., Risse B., et al. Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin-12 against toxoplasmosis in mice. // *Infect. Immun.* 1998: v.66, № 9, p.4503-4506.
61. Lindblad E.B., Elhay M.J., Silva R., Appelberg R., Andersen P. Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines. // *Infect. Immun.* 1997: v. 65, № 2, p. 623-629.

62. Maes R.F. Tuberculosis II: The failure of the BCG vaccine // *Med. Hypothesis* 1999: v.53, № 1, p.32-39.
63. Massasia M., Borrione P., Battaglio S. et al. Idiotypic vaccination in human myeloma: generation of tumor-specific immune responses after high-dose chemotherapy. // *Blood* 1999: v.94, № 2, p.673-683.
64. McCullough K.C., Pullen L., and Parkinson D. The immune response against foot-and-mouth disease virus: influence of the T lymphocyte growth factors IL-1 and IL-2 on the murine humoral response *in vivo*. // *Immunol. Lett.* 1991: v.31, p.41-46.
65. McLaughlin J.P., Schlom J., Kantor J.A., and Greiner J.W. Improved immunotherapy of a recombinant carcinoembryonic antigen vaccinia vaccine when given in combination with interleukin-2. // *Cancer Res.* 1996: v.56, p.2361-2367.
66. Mebra N.K. Major histocompatibility complex and future vaccination strategies // *Proc. Indian. Nat. Sci. Acad. B.* 1998: v.64, № 2, p.81-100.
67. Meuer S.C., Dumann H., Meyer Zum Buschenfelde K.H., et al. Low-dose interleukin-2 induces systemic immune responses against HbsAg in immunodeficient non-responders to hepatitis B vaccination. // *Lancet* 1989: v.1, p.15-18.
68. Moller P., Moller H., Sun Y., et al. Increased non-major histocompatibility complex-restricted lytic activity in melanoma patients vaccinated with cytokine gene-transfected autologous tumor cells. // *Cytokine* 2000: v.12, № 6, p.828-833.
69. Nair S.K. Immunotherapy of cancer with dendritic cell-based vaccines // *Gene Ther.* 1998: v.5, № 11, p.1445-1446.
70. Nencioni L., Villa L., Tagliabue A. et al. In vivo immunostimulatory activity of the 163-171 peptide of human IL-1b. // *J. Immunol.* 1987: v.139, p.800-804.
71. Nobiron I., Thompson I., Brownlie J., Collins M.E. Co-administration of IL-2 enhances antigen-specific immune responses following vaccination with DNA encoding the glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus. // *Vet. Microbiol.* 2000: v.76, № 2, p.129-142.
72. Notria A., Rubin R.H. Cytokines as potential vaccine adjuvants // *Biotherapy* 1994: v.7, p.261-269.
73. Nunberg J.H., Doyle M.V., York S.M & York C.J. Interleukin 2 acts as an adjuvant to increase the potency of inactivated rabies virus vaccine. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1989: v.86, p.4240-4243.
74. Okada E., Sasaki S., Ishii N., et al. Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-expressing plasmids in liposomes induces strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigens. // *J. Immunol.* 1997: v.159, p.3638.
75. Pardoll D.M. Cancer vaccines. // *Immunol today.* 1993: v.14, p.310.
76. Pardoll D.M. Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. // *Ann. Rev. Immunol.* 1995: v.13, p.399-415.

77. Parmiani G., Rodolfo M., Melani C. Immunological gene therapy with ex vivo gene-modified tumor cells: a critique and a reappraisal. // *Hum. Gene Ther.* 2000: v.11, № 9, p.1269-1275.
78. Pasquini S., Xiang Z., Wang Y., et al. Cytokines and costimulatory molecules as genetic adjuvants. // *Immunol. Cell Biol.* 1997: v.75. № 4, p.397-401.
79. Perrin P., Joffret M.L., Zanetti C., et al. Interleukin 2 increases protection against experimental rabies. // *Immunology* 1988: v.177, p.199-209.
80. Pighetti G.M., Sordillo L.M. Enhanced antigen-specific responses in bovine mammary glands following administration of interleukin-2. // *J. Dairy Sci.* 1995: v.78, № 3, p.528-537.
81. Playfair J.H.L., DeSouza J.B. Recombinant gamma interferon is a potent adjuvant for a malaria vaccine in mice. // *Clin. Exp. Immunol.* 1987: v.6, p.5-10.
82. Provinciali M., Di Stefano G., Colombo M., et al. Adjuvant effects of low dose interleukin-2 on antibody response to influenza virus vaccination in healthy elderly subjects. // *Mech. Aging Dev.* 1994: v.77, p.75-82.
83. Rajanathanan P., Attard G.S., Sheikh N.A., Morrow W.J. Novel aggregate structure adjuvants modulate lymphocyte proliferation and Th1 and Th2 cytokine profiles in ovalbumin immunized mice. // *Vaccine* 1999: v.18, № 1-2, p.140-152.
84. Rao K.V.S., Nayak A.R. Enhanced immunogenicity of a sequence derived from hepatitis B virus surface antigen in a composite peptide that includes the immunostimulatory region from interleukin 1. // *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 1990: v.87, p.5519-5522.
85. Reddy D.N., Reddy P.G., Xue W., et al. Immunopotential of bovine respiratory disease virus vaccines by interleukin-1 $\beta$  and interleukin-2. // *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1993: v.37, p.25-38.
86. Rosenberg S.A. The development of cancer vaccines. // 8<sup>th</sup> Intern. Congress of Anti-Cancer Treatment 1998, p.120.
87. Rosenberg S.A., Yang J.C., Schwartzentruber D.J. et al. Impact of cytokine administration on generation of antitumor reactivity in patients with metastatic melanoma receiving a peptide vaccine. // *J. Immunol.* 1999: v.163, № 3, p.1690-1695.
88. Sasaki S., Tsuji T., Asakura Y. et al. The search for a potent DNA vaccine against AIDS: The enhancement of immunogenicity by chemical and genetic adjuvants // *Anticancer Res.* 1998: v.18, № 5d, p.3907-3915.
89. Schijns V.E.C.J., Claassen I.Th.M., Vermeulen A.A., Horzinek M.C., and Osterhaus A.D.M.E. Modulation of antiviral immune responses by exogenous cytokines: effects of tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-2 and interferon- $\gamma$  on the immunogenicity of an inactivated rabies vaccine. // *J. Gen. Virol.* 1994: v.75, p.55-63.
90. Shahum E., Therien H.M. Liposomal adjuvanticity: effect of encapsulation and surface-linkage on antibody production and proliferation response. // *Int J Immunopharmacol* 1995: v.17, № 1, p.9-20.

91. Sin J-I., Kim J.J., Boyer J.D., Ciccarelli R.B., Higgins T.J., and Weiner D.B. In vivo modulation of vaccine-induced immune responses toward a Th1 phenotype increases potency and vaccine effectiveness in a herpes simplex virus type 2 mouse model. // *J. Virol.*, 1999: v.73, № 1, p.501-509.
92. Sivanandham M., Scoggin S.D., Tanaka N., Wallack M.K. Therapeutic effect of a vaccinia colon oncolysate prepared with interleukin-2 encoded vaccinia virus studied in a syngeneic CC-36 murine colon hepatic metastasis model. // *Cancer Immunol. Immunother.*, 1994: v.38, p.259-264.
93. Sjolander A., Bengtsson K.L., Morein B. Kinetics, localisation and cytokine profile of T-cell responses to immune stimulating complexes (iscoms) containing human influenza virus envelope glycoproteins. // *Vaccine*, 1997: v.15, № 9, p.1030-1038.
94. Souberbielle B.E., Knight B.C., Morrow W.J., et al. Comparison of IL-2- and IL-4-transfected B16-F10 cells with a novel oil-microemulsion adjuvant for B16-F10 whole cell tumour vaccine. // *Gene Ther.* 1996: v.3, № 10, p.853-858.
95. Staib L., Herlin D., Braumuller H., et al. Vaccination of colorectal and pancreatic cancer patients with baculovirus-derived extracellular domain of GA733 antigen. // *Europ. J. Cancer* 1997: v.18, p.370.
96. Staruch M.J. & Wood D.D. The adjuvanticity of interleukin 1 *in vivo*. // *J. Immunol.* 1983: v.130, p.2191-2194.
97. Stevenson F.K., Zhu D., King C.A., et al. A genetic approach to idiotypic vaccination for B cell lymphoma. // *Ann. NY Acad. Sci.* 1995: v.772, p.212-226.
98. Tagliabue A., Boraschi D. Cytokines as vaccine adjuvants: interleukin 1 and its synthetic peptide 163-171. // *Vaccine* 1993: v.11, p.594-595.
99. Tahara H., Zitrovel L., Storkus W.J., Elder E.W. Phase I clinical trial of IL-2 gene therapy using direct injection of tumors with genetically engineered autologous fibroblasts. // *Proc. Ann. Cl. Oncol.* 1996: v.15, p.A579.
100. Tarasov V.A., Filatov M.V., Kisliakova T.V. et al. Combined surgical and immunotherapeutic treatment of patients with fourth stage colon cancer // *Hybridoma*, 1999: v.18, №1, p.99-102.
101. Tjou B.A., Lodge P.A., Salgaller M.L. et al. Dendritic cell-based immunotherapy for prostate cancer // *Cancer J. Clin.* 1999: v.49, № 2, p.117-128.
102. Tough D.F., Sun S., Zhang X., Sprent J. Stimulation of naïve and memory T cells by cytokines. // *Immunol. Rev.* 1999: v.170, p.39-47.
103. Townsend S.E., Allison J.P. Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. // *Science* 1993: v.259, p.368.
104. Tsuij T., Hamajima K., Fukushima J., et al. Enhancement of cell-mediated immunity against HIV-1 induced by coinoculation of plasmid-encoded HIV-1 antigen with plasmid expressing IL-12. // *J. Immunol.* 1997: v.158, p.4008.
105. Weinberg A., Merigan T.C. Recombinant interleukin 2 as an adjuvant for vaccine-induced protection: immunization of guinea pigs with herpes simplex virus subunit vaccines. // *J. Immunol.* 1988: v.140, p.294-299.

106. Xin K.Q., Hamajima K., Sasaki S., et al. IL-15 expression plasmid enhances cell-mediated immunity induced by an HIV-1 DNA vaccine. // *Vaccine*, 1999: v.17, № 7-8, p.858-866.
107. Xin K.Q., Hamajima K., Sasaki S., et al. Intranasal administration of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) DNA vaccine with interleukin-2 expression plasmid enhances cell-mediated immunity against HIV-1. // *Immunology*, 1998: v.94, № 3, p.438-444.