

Paulina Górska

HUMORALNA ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNA U ZWIERZĄT DOŚWIADCZALNYCH PO IMMUNIZACJI REKOMBINOWANYMI SZCZEPIONKAMI PRZECIW WIRUSOWEMU ZAPALENIU WĄTROBY TYPU B RÓŻNYCH GENERACJI¹

Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Państwowy Zakład Higieny, Warszawa
Kierownik: Janusz Ślusarczyk

W pracy podjęto próbę oceny różnic pomiędzy humoralną odpowiedzią odpornościową uzyskaną po immunizacji myszy szczepionką przeciw wzv B II generacji, zawierającą tylko antygen powierzchniowy S (szczepionka S) oraz po podaniu szczepionki III generacji, wzbogaconej o białko pre-S (szczepionka S + pre-S). Badania przeprowadzono zarówno w oparciu o zalecenia Farmakopei Europejskiej dotyczące procedury badawczej szczepionek przeciw wzv B, oraz po podaniu dawki przypominającej w celu porównania odpowiedzi anamnesticznej w modelu doświadczalnym.

Słowa kluczowe: wzv B, szczepionki, humoralna odpowiedź immunologiczna
Key words: hepatitis B, vaccines, humoral immunological response

WSTĘP

Wirusowe zapalenie wątroby typu B stanowi wciąż ogólnoswiatowy problem zdrowotny. Pomimo istnienia skutecznych i bezpiecznych szczepionek, liczbę osób przewlekle zakażonych na świecie ocenia się na około 350 milionów (1). Obecnie stosowane szczepionki należą do preparatów bezpiecznych i dobrze chroniących przed zakażeniem, a dynamika zapadalności wykazuje tendencje spadkowe, jednak 5-10% osób szczepionych nie wytwarza odporności (2, 3, 4).

Obecnie produkuje się głównie szczepionki II i III generacji. Do II generacji należą preparaty rekombinowane, zawierające białko S jako wynik ekspresji genu kodującego HBsAg w komórkach drożdży, natomiast III generację stanowią szczepionki, w których skład

1 Niniejsza praca stanowi fragment rozprawy doktorskiej P. Górskiej pt. „Anamnesticzna odpowiedź immunologiczna u zwierząt doświadczalnych po immunizacji rekombinowanymi szczepionkami przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu B różnych generacji” .

wchodzą trzy białka: HBsAg, preS 1 i preS2. Preparaty te mają w założeniu być bardziej immunogenne niż dotychczas istniejące szczepionki, co może mieć znaczenie zwłaszcza u osób słabo lub wcale nieodpowiadających na szczepienie szczepionkami II generacji (5). Szczepionki III generacji nie są dotychczas zarejestrowane w Polsce.

W ramach niniejszej pracy podjęto próbę porównania i oceny różnic pomiędzy humoralną odpowiedzią odpornościową uzyskaną po immunizacji myszy szczepionką II generacji, zawierającą w swym składzie tylko antygen powierzchniowy S (szczepionka S), oraz po podaniu szczepionki III generacji, wzbogaconej o białka pre-S (szczepionka S + pre-S). W pierwszym etapie badań immunizowano zwierzęta jednokrotnie różnymi rozcieńczeniami badanych preparatów, opierając się na farmakopealnym modelu badania szczepionek przeciwko wzw B (6). Na podstawie wyników tych doświadczeń do dalszych badań wybrano dwie dawki preparatów: 0,2 µg/ml (niską) i 2 µg/ml (wysoką). Po uzyskaniu znaczących różnic w uzyskanej odpowiedzi immunologicznej, w następnym etapie badań zmieniono schemat wykonania badań doświadczalnych, poszerzając je o ocenę odpowiedzi anamnesticznej po podaniu dawek przypominających obu szczepionek w modelu doświadczalnym.

MATERIAŁ I METODY

Do immunizacji zwierząt stosowano szczepionkę S oraz szczepionkę PreS + S. Badania przeprowadzono na myszach Balb/c (szczep wsobny). Do badań wykorzystywano zwierzęta wolne od specyficznych patogenów (SPF, *Specified Pathogen Free*), samice w wieku 5-6 tygodni, pochodzące z Centrum Medycyny Doświadczalnej PAN w Warszawie. Jedną grupę myszy szczepiono dootrzewnowo dawką 0,2 µg/ml badanych szczepionek, drugą grupę dawką 2 µg/ml, w trzeciej grupie kontrolnej podawano bufor PBS. Po upływie 20 dni od immunizacji, od 6 zwierząt z każdej grupy pobierano krew z naczyń ocznych, a pozostała część grupy (6 myszy) była ponownie szczepiona tą samą dawką szczepionki, która była używana do immunizacji pierwotnej. Po 7 dniach od drugiego szczepienia pobierano od myszy krew w anestezji przy użyciu halotanu (Narcotan®).

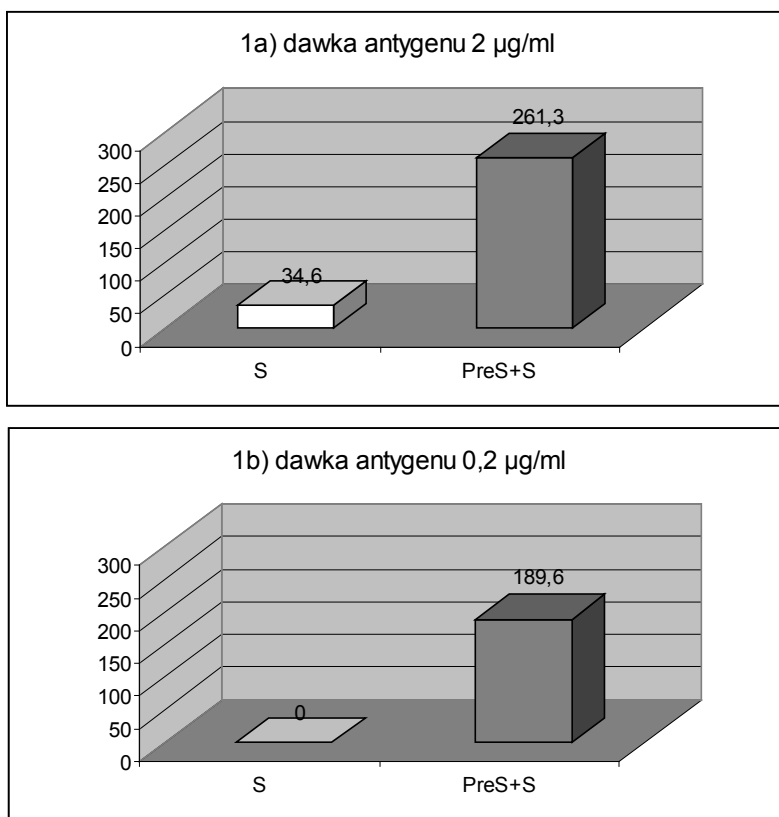
Poziom przeciwciał anti-HBs we krwi obwodowej immunizowanych myszy oceniano przy użyciu testu immunoenzymatycznego ELISA (Hepanostika anti-HBs, Organon) zgodnie z instrukcją producenta.

Badanie proporcji składu ilościowego przeciwciał podklas IgG1 oraz IgG2a po szczepieniu myszy badanymi preparatami wykonywano za pomocą immunoenzymatycznego testu ELISA, we własnym opracowaniu. Płytkę opłaszczano szczepionką zawierającą antygen HBs, z którym wiązały się przeciwciała obecne w surowicy immunizowanych myszy. Następnie dodawano przeciwciała detekcyjne wyznakowane enzymem peroksydazą chrzanową HRP (skierowane przeciw mysim przeciwciałom należącym do podklasy IgG1 lub IgG2a), wiążące się z odpowiadającymi im podklasami przeciwciał związanych z antygenem HBs, którym opłaszczono płytkę. Po dodaniu substratu dla enzymu uzyskiwano reakcję barwną, o natężeniu proporcjonalnym do ilości kompleksów przeciwciał danej podklasy z przeciwciałami detekcyjnymi. Dokonywano odczytu absorbancji, a następnie liczono średnią ekstynkcji uzyskaną dla przeciwciał podklasy IgG1 oraz IgG2a i wyliczano proporcję ich składu ilościowego.

WYNIKI

Uzyskane wyniki wykazały, że jednorazowe podanie dawki 2 $\mu\text{g/ml}$ szczepionki PreS + S wywołało znacznie wyższą odpowiedź humoralną w porównaniu do szczepionki S. Wynosiła ona odpowiednio 261,3 \pm 19,9 mIU/ml i 34,6 \pm 13,3 mIU/ml (różnica statystycznie istotna, $p = 0,000005$). Po jednej dawce 0,2 $\mu\text{g/ml}$ szczepionki PreS + S poziom przeciwciał wynosił średnio 189,6 \pm 57,6 mIU/ml, po szczepionce S nie uzyskano syntezy przeciwciał.

Po podaniu dawki przypominającej szczepionki PreS + S (2 $\mu\text{g/ml}$) uzyskana odpowiedź była znacznie wyższa niż po immunizacji szczepionką S, poziom przeciwciał wynosił



Ryc. 1. Poziom przeciwciał (mIU/ml) w surowicy myszy po jednokrotnym szczepieniu szczepionkami S oraz PreS+S

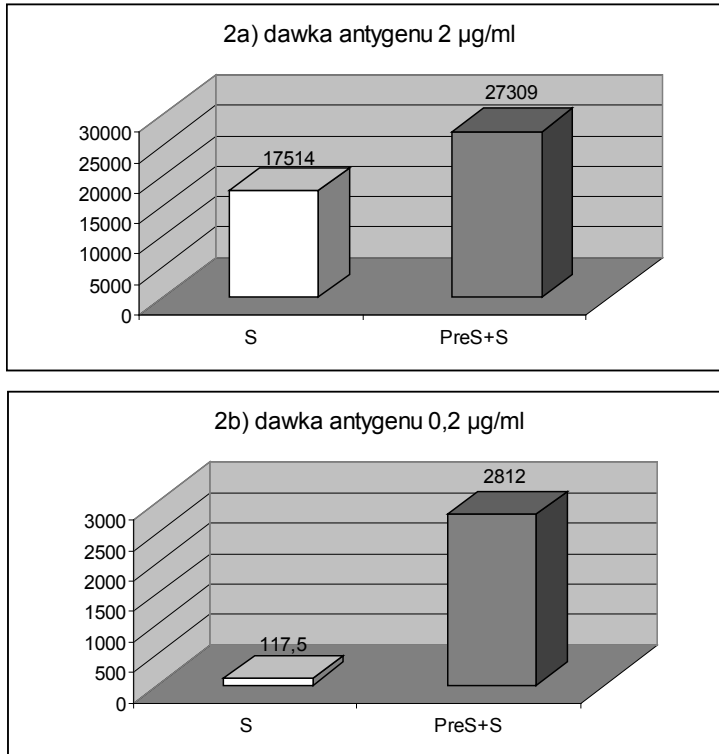
1a) dawka antygeny 2 $\mu\text{g/ml}$

1b) dawka antygeny 0,2 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 1. Antibody level (mIU/ml) in mice sera after single administration of S and PreS + S vaccines

1a) antigen dose 2 $\mu\text{g/ml}$

1b) antigen dose 0,2 $\mu\text{g/ml}$



Ryc. 2. Poziom przeciwciał (mIU/ml) w surowicy myszy po podaniu dawki przypominającej szczepionek S oraz PreS+S

2a) dawka antygeny 2 µg/ml

2b) dawka antygeny 0,2 µg/ml

Fig. 2. Antibody level (mIU/ml) in mice sera after administration of booster dose of S and PreS + S vaccines

2a) antigen dose 2 µg/ml

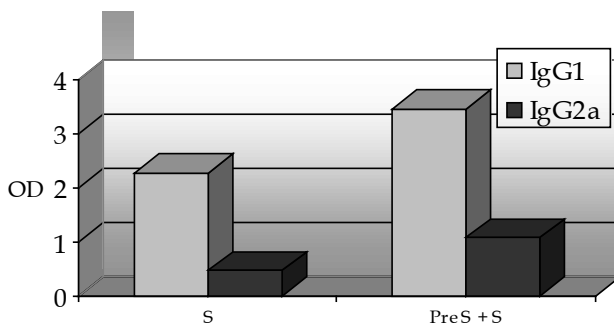
2b) antigen dose 0,2 µg/ml

odpowiednio $27309 \pm 1797,32$ mIU/ml oraz $17514 \pm 1061,12$ mIU/ml (różnica statystycznie istotna, $p = 0,00003$). Po dwóch dawkach 0,2 ug/ml uzyskano wyższy poziom przeciwciał po szczepionce PreS + S ($2812 \pm 123,67$ mIU/ml) w porównaniu do szczepionki S ($117,5 \pm 24,27$ mIU/ml). Różnica była statystycznie istotna ($p = 0,0000004$).

Porównanie poziomu przeciwciał anti-HBs uzyskanych po immunizacji szczepionkami PreS + S oraz S przedstawiają ryciny 1a-b oraz 2 a-b.

Oznaczenie proporcji składu ilościowego przeciwciał podklas anti-HBs IgG (IgG1 i IgG2a) wykonano w surowicy myszy po podaniu dawki przypominającej szczepionek S oraz PreS + S (2 µg/ml). Po immunizacji szczepionką S stosunek IgG1 / IgG2a wyniósł średnio $4,8 \pm 0,37$, a po szczepieniu szczepionką PreS + S $3,2 \pm 0,38$ (różnica statystycznie istotna, $p = 0,0002$).

Porównanie proporcji składu ilościowego przeciwciał anti-HBs podklas IgG1 i IgG2a obrazuje rycina 3.



Ryc. 3. Podklasy przeciwciał anti - HBs w surowicach myszy immunizowanych szczepionkami S oraz PreS + S po podaniu dawki przypominającej (dawka antygeny 2 $\mu\text{g/ml}$)

Fig. 3. Antibody subclasses in the sera of mice vaccinated with booster dose of S and PreS + S vaccines (antigen dose 2 $\mu\text{g/ml}$)

DYSKUSJA

Wyniki badań eksperymentalnych wykazały, że przeciwciała anti-HBs w klasie IgG były wykrywalne już po pierwszym podaniu dawki 0,2 $\mu\text{g/ml}$ szczepionki PreS + S, podczas gdy szczepionka S w tych warunkach nie indukowała odpowiedzi humoralnej z udziałem IgG. Może to świadczyć, że odpowiedź humoralna po podaniu szczepionki III generacji jest nie tylko bardziej nasiloną niż po immunizacji preparatem zawierającym tylko białko S, ale również rozwija się szybciej i dynamiczniej. Dziesięciokrotnie wyższa dawka 2 $\mu\text{g/ml}$ szczepionki S po jednokrotnym szczepieniu indukowała syntezę przeciwciał, jednak na znacznie niższym poziomie w porównaniu do szczepionki PreS + S.

Po podaniu dawki przypominającej szczepionki PreS + S uzyskano znamienne wyższą syntezę przeciwciał anti-HBs klasy IgG w porównaniu do szczepionki S. Immunizacja szczepionką PreS + S musiała więc generować znacznie szybciej i na wyższym poziomie anamnesticzną odpowiedź typu humoralnego niż szczepienie szczepionką S.

Analiza proporcji składu ilościowego podklas przeciwciał wykazała, że zarówno po immunizacji szczepionką S, jak i PreS + S uzyskano stosunek podklas IgG1 do IgG2a większy od jedności, co świadczy o przewadze odpowiedzi immunologicznej typu Th2.

Zdolność szczepionki PreS + S do indukowania znacznie wyższego miana przeciwciał anti-HBs niż szczepionka S może być związana z obecnością na fragmentach pre-S epitopów lepiej ilościowo i jakościowo rozpoznawalnych przez komórki Th i silniejszym wspomaganie syntezy przeciwciał przez komórki. Skład i właściwości fizyczne szczepionki sprzyjają również wydajniejszej prezentacji przez komórki APC. Domena pre-S1 ma zdolność wiązania z hepatocytami, a pre-S2 wiąże ludzką albuminę surowicy krwi (HSA – *human serum albumin*), która wiąże się z komórkami wątroby. Przeciwciała swoiste dla antygenów pre-S wirusa mogą więc blokować wnikanie HBV do hepatocytów (5, 7).

Wyniki badań wykazały, że szczepionka PreS + S charakteryzuje się wyższą immunogennością w porównaniu do szczepionki S w odniesieniu do humoralnej odpowiedzi odpornościowej. Udoskonalona szczepionka przeciw wzv B III generacji może więc znaleźć zastosowanie w uodparnianiu osób słabo odpowiadających na szczepienie (8-11).

Zastosowanie nowych, skuteczniejszych szczepionek być może przyczyni się również do skrócenia czasu uodpornienia w programie szczepień ochronnych przeciw HBV oraz w leczeniu przewlekłego wzv B (12). W latach 90-tych podjęto pierwsze próby leczenia przewlekłej postaci wzv B przy użyciu antygenów szczepionkowych. (13). Immunoterapia przewlekłego zakażenia HBV, charakteryzującego się niedostateczną odpowiedzią komórek pomocniczych T, polega na strategii, która w założeniu powinna wywoływać powstawanie swoistych przeciwciał, maszyną proliferację jednojądrzastych komórek krwi obwodowej oraz wzbudzanie produkcji IFN- α (14, 15, 16, 17). Podejmowane były również próby immunoterapii skojarzonej, polegającej na uodpornieniu pacjentów antygenem HBs oraz jednoczesnym podawaniu IFN- α (18, 19).

Prawdopodobnie przyszłe szczepionki przeciwko wzv B będą zawierać w swym składzie także inne białka HBV, a w obliczu pojawiania się coraz to nowych mutacji wirusa HBV, być może będą zawierać również sekwencje mutantów HBV.

WNIOSKI

- Po podaniu jednej niskiej dawki (0,2 $\mu\text{g/ml}$) badanych szczepionek odpowiedź humoralną uzyskano jedynie po immunizacji szczepionką PreS + S, co może świadczyć o wyższej dynamice powstawania odpowiedzi humoralnej po podaniu szczepionki III generacji; może się to przyczynić do skrócenia czasu uodpornienia w schemacie szczepień ochronnych przeciwko wzv B.
- Po podaniu dwóch dawek szczepionki PreS + S uzyskano znamiennie wyższą syntezę przeciwciał anti-HBs klasy IgG w porównaniu do szczepionki S, co może mieć znaczenie w uodparnianiu przeciwko wzv B osób z grupy słabo lub wcale nieodpowiadających na rutynowe szczepienie.

P Górski

HUMORAL IMMUNOLOGICAL RESPONSE IN LABORATORY ANIMALS AFTER VACCINATION WITH RECOMBINANT VACCINES AGAINST VIRAL HEPATITIS B OF DIFFERENT GENERATIONS

SUMMARY

Currently available hepatitis B vaccines belong to the II or III generation. II generation vaccines include preparations containing recombinant HBsAg as a result of expression of only HBsAg coding gene in yeast or in mammalian cells, while to the III generation belong vaccines that contain in addition to HBsAg also other viral proteins: preS1 and preS2. They are presumed to be more immunogenic than II generation vaccines, which may be of importance for immunization of people with poorly induced immunological response after vaccination.

After single administration of low dose (0,2 µg/ml) of tested vaccines humoral response was obtained only after vaccination with PreS + S vaccine, which may indicate higher dynamics of humoral response generation in case of the III generation vaccine. After vaccination with two doses of PreS+S vaccine the level of humoral response was significantly higher in comparison with S vaccine. It could be speculated that such a vaccine might be useful as an alternative for immunization against hepatitis B persons with poor or without any immunological response after routine vaccination schedule.

PIŚMIENICTWO

1. Zuckerman JN. Protective efficacy, immunotherapeutic potential and safety of hepatitis B vaccines. *J Med Virol* 2006, 78(2): 169-77.
2. Rendi-Wagner P, Shouval D, Genton B i in. Comparative immunogenicity of a PreS/S hepatitis B vaccine in non- and low responders to conventional vaccine. *Vaccine*. 2006; 24(15):2781-9.
3. Yucesoy B, Sleijffers A, Kashon M i in. IL-1 beta gene polymorphisms influence hepatitis B vaccination. *Vaccine* 2002; 20(25-26): 3193-6.
4. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004, 11(2):97-107.
5. Madalinski K, Sylvan SP, Hellstrom U. Presence of anti-preS1, anti-preS2, and anti-HBs antibodies in newborns immunized with Bio-Hep-B vaccine. *Med Sci Monit* 2004; 10(1):P 110-7
6. Farmakopea Europejska, wyd. V 2005, tom I, 2.7.15. Assay of hepatitis B vaccine (rDNA), 207-208.
7. Jones CD., Page M, Bacon A. T-cell and antibody response characterization of a new recombinant pre-S1 and pre-S2 and SHBs antigen-containing hepatitis vaccine; demonstration of superior anti-SHBs antibody induction in responder mice. *Vaccine* 1999; 17: 2528-2537.
8. Pride MW., Bailey CR., Muchmore E. Evaluation of B and T-cell responses in chimpanzees immunized with Hepagene, a hepatitis vaccine containing pre-S1, pre-S2 and SHBs products. *Vaccine* 1998; 16 (6): 543-550.
9. Milich DR. McLachlan A, Chisari FV. Immune response to the pre-S(1) region of the hepatitis surface antigen (HBsAg): a pre-S(1)-specific T cell response can bypass nonresponsiveness to the pre-S(2) and S regions of HBsAg. *J Immunol* 1986; 137 (1): 315-322.
10. Leroux-Roels G, Desombere I, Cobbaut L. Hepatitis vaccine containing surface antigen and selected PreS1 and PreS2 sequences. Immunogenicity in poor responders to hepatitis vaccines. *Vaccine* 1997; 15 (16): 1732-1736.
11. Shouval D, Ilan Y, Adler R. Improved immunogenicity in mice of a mammalian cell-derived recombinant hepatitis vaccine containing pre-S1 and pre-S2 antigens as compared with conventional yeast-derived vaccines. *Vaccine* 1994; 12: 1453-1459.
12. Young MD, Schneider DL., Zuckerman AJ. Adult hepatitis vaccination using a novel triple antigen recombinant vaccine. *Hepatology* 2001; 34 (2): 372-376.
13. Couillin I, Pol S, Mancini M. Specific vaccine therapy in chronic hepatitis: induction of T cell proliferative responses specific for envelope antigens. *J Infect Dis* 1999; 180: 15-26.
14. Lohr H, Weber W, Schlaak J. Proliferative response of CD4+ T cells and hepatitis virus clearance in chronic hepatitis with or without hepatitis B e-minus hepatitis virus mutants. *Hepatology* 1995; 22:11.
15. Schlaak JF., Tully G, Lohr HF. HBV-specific immune defect in chronic hepatitis (CHB) is correlated with a dysregulation of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Clin Exper Immunol* 1999; 115: 508-514.
16. Tsai SL., Chen PJ., Lai MY. Acute exacerbations of chronic type B hepatitis are accompanied by increased T cell responses to hepatitis B core and e antigens. *J Clin Invest* 1992; 89: 87-96.

17. Livingstone BD., Alexander J, Crimi C. Altered helper T lymphocyte function associated with chronic hepatitis virus infection and its role in response to therapeutic vaccination in humans. *J Immunol* 1999; 5: 3088-3095.
18. Heintges T, Petry W, Kaldewey M. Combination therapy of active HBs vaccination and interferon-alfa in interferon-alfa nonresponders with chronic hepatitis. *Digest Dis Sci* 2001; 46: (4) 901-906.
19. Juszczak J. *Wirusowe zapalenie wątroby*. Wyd. 1. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 1999: 169174.

Otrzymano: 6.02.2007 r.

Adres autorki:

Dr Paulina Górski

Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Państwowy Zakład Higieny

ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Tel.: 022-5421 347, Fax: 022-5421 311

e-mail: pgorska@pzh.gov.pl