УДК616.98:578.833.29]-06:616.61-008.6]-085.371/.372

О. В. Чубукова, Ю. М. Никоноров

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН (г. Уфа)

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДНК-ВАКЦИН В ПРОФИЛАКТИКЕ ХАНТАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Ключевые слова: хантавирусы, ДНК-вакцины, иммунный ответ.

Метод ДНК-вакцинации основан на введении в организм плазмидной ДНК, кодирующей белок патогена. Такой подход позволяет получить полный иммунный ответ к различным бактериальным и вирусным антигенам. В данном обзоре рассматриваются перспективы создания ДНК-вакцины на основе структурных генов вируса— возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом, а также проблемы, возникающие при создании таких вакцин.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) — широко распространенное в странах Евразии вирусное природно-очаговое заболевание. Возбудителями ГЛПС являются РНК-содержащие вирусы, относящиеся к семейству Буньявириде (*Bunyaviridae*) рода Хантавирус (*Hantavirus*). В конце XX века в мире ежегодно регистрировалось более 150 тыс. случаев ГЛПС, вызванных хантавирусами, причем летальность от данного заболевания в разные годы составляла от 1 до 22% [24]. Проблема хантавирусных инфекций актуальна и для России, на территории которой находятся крупные эпидемические очаги ГЛПС [2].

В настоящее время отсутствуют эффективные специфические средства для профилактики и лечения ГЛПС. Лицензированные промышленные вакцины, существующие на сегодняшний день, созданы на основе вирусов серотипов Хантаан (*Hantaan*) и Сеул (*Seoul*), циркулирующих преимущественно в странах Азии — Китае и Южной Корее. Однако по результатам клинических исследований эти вакцинные препараты оказались неспособны индуцировать устойчивый специфический иммунитет у людей и могут быть рекомендованы только для лиц, чья профессиональная деятельность сопряжена с кратковременным пребыванием в эпидемиологически неблагополучной местности. Только у 50% реципиентов, иммунизированных инактивированными хантавирусными вакцинами (Хантавакс и комбинированная вакцина Хантаан-Пуумала), через год после последней инъекции были выявлены специфические нейтрализующие антитела [6].

В России подобные вакцины отсутствуют или только разрабатываются, а применение в профилактических целях вышеуказанных препаратов может оказаться малоэффективным, поскольку основным этиологическим агентом, вызывающим ГЛПС на территории нашей страны, является вирус серотипа Пуумала (*Puumala*), а в последнее десятилетие актуальность приобрел вирус Добрава (*Dobrava*) [2].

Проблемы, сопровождающие процесс создания вакцин против хантавирусных инфекций по традиционной технологии, а также зачастую их недостаточная эффективность способствуют поиску альтер-

нативных методов для разработки новых вакцинных препаратов. Одним из таких методов является ДНК-иммунизация.

ДНК-вакцины представляют собой сравнительно новый тип вакцин, принцип применения которых заключается в том, что в организм вводят ДНК (или РНК), кодирующую гены белков, к которым необходимо получить иммунный ответ.

Первая работа, сообщавшая о ДНК-вакцинации, появилась в 1990 г. [28]. В 1992—1993 гг. независимые группы исследователей впервые продемонстрировали, что ДНК-вакцинация вызывает у мышей полноценный иммунный ответ, т.е. образуются специфические антитела (гуморальный ответ) и цитотоксичные Т-лимфоциты (клеточный ответ) [25].

Для получения ДНК-вакцины требуется встроить ген, кодирующий интересующий белок, в специальный плазмидный вектор, трансформировать полученной конструкцией бактериальные клетки и затем выделить из них плазмидную ДНК. Очищенная ДНК и служит вакциной. Плазида, введенная в эукариотический организм, оказывается неспособной к репликации (поскольку не несет эукариотической точки инициации репликации), но длительное время (более года) существует в ядре клетки в виде эписомы, не встраиваясь в геном, и поддерживает синтез кодируемых ею белков в течение недель или месяцев. Это явление получило название временной или транзиторной экспрессии [10, 14].

На данный момент можно считать доказанным тот факт, что ДНК-вакцинация является эффективным способом выработки как гуморального, так и клеточного иммунного ответа против широкого диапазона вирусных, бактериальных и паразитических антигенов в различных животных моделях [10, 14, 18].

Спектр методов доставки ДНК при генетической иммунизации довольно широк. Наиболее простым и распространенным является внутримышечная или подкожная инъекция ДНК на физиологическом растворе [1]. Особую популярность получил метод введения в клетку-мишень ДНК, зафиксированной на микроскопических золотых гранулах с помощью «генного ружья» [10]. Кроме того, в литературе упоминаются: интраназальная доставка, доставка ДНК в липосомах, полимерных частицах, биodeградирующих микрочастицах, сорбированной на наночастицы, электропорация *in vivo* [18, 21].

В настоящее время большинство используемых лицензированных вакцин, за исключением живых аттенуированных, индуцируют преимущественно

гуморальный иммунный ответ. Это обусловлено тем, что при вакцинации традиционными вакцинами антиген поступает в организм экзогенно в больших количествах и существует в нем в неизменном виде сравнительно недолго. При этом введенный антиген улавливается антигенпредставляющими клетками, в лизозомах которых гидролизуется до пептидов. Далее они связываются с белками главного комплекса гистосовместимости класса II. Образовавшийся зрелый комплекс презентуется на поверхности антигенпредставляющих клеток Т-хелперным лимфоцитам типа CD4+. Таким образом, обычная вакцинация сопровождается Т-хелперным ответом 2-го типа, который характеризуется выработкой Т-хелперами интерлейкинов 4, 5, 6 и 10, продукцией плазматическими клетками иммуноглобулинов G1 и E, активацией эозинофилов [1].

При ДНК-вакцинации иммуногенный белок синтезируется клетками самого организма в нативной форме, в небольших количествах и в течение довольно длительного времени. Синтезированный эндогенно антиген гидролизуется в цитозоле антигенпредставляющих клеток. Образовавшиеся короткие пептиды переносятся в эндоплазматический ретикулум, где связываются с молекулами класса главного комплекса гистосовместимости класса I и затем транспортируются к клеточной поверхности для распознавания Т-лимфоцитами типа CD8+. В свою очередь Т-лимфоциты организуют иммунный ответ, стимулируя выработку антител В-клетками, клональную экспансию цитотоксических Т-лимфоцитов и активируя макрофаги-киллеры [1]. В результате ДНК-иммунизации формируется преимущественно Т-хелперный ответ 1-го типа, который заключается в синтезе у-интерферона и интерлейкина-2. Конечным итогом иммунного ответа здесь является образование активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, продукция плазматическими клетками антител класса иммуноглобулинов G2a и G2b, активация макрофагов [22]. Особенно важно, что, используя тот или иной способ доставки ДНК, можно изменять тип иммунного ответа. Так, например, внутримышечное введение индуцирует преимущественно Т-хелперный ответ 1-го типа, тогда как иммунизация «генным ружьем» индуцирует доминирующую реакцию Т-хелперов 2-го типа [1].

В идеале однократное введение ДНК-вакцины должно вызывать устойчивый сильный гуморальный и клеточный иммунный ответ. В настоящее время наибольшие успехи достигнуты при генетической иммунизации грызунов, тогда как у крупных животных и людей ДНК-вакцины вызывают слабый или неустойчивый ответ даже после многократного введения больших доз ДНК [3, 10]. Для решения этой проблемы разрабатываются различные стратегии. Одной из них является повышение эффективности трансфекции клеток за счет оптимизации системы доставки [18]. Другой подход заключается во включении в векторную ДНК последовательностей, которые усиливают межклеточный транспорт антигена к

антигенпредставляющим клеткам и эффективность презентации его Т-лимфоцитам [19]. Иммуногенность ДНК-вакцин повышают за счет усиления экспрессии целевого гена, введения в плазмиду последовательностей, обладающих иммуностимулирующим эффектом — CpG-повторов, цитокинов [14, 17].

Основные опасения по применению описываемых вакцин связаны с возможностью неконтролируемого встраивания вводимой ДНК в те или иные участки генома, что может привести к нарушению функций любых генов. Однако в экспериментах по генетической иммунизации грызунов введенная ДНК не обнаруживалась в препаратах хромосомной ДНК [1, 8].

Известно, что при хантавирусной инфекции иммунный ответ вызывают вирусные гликопротеины G1 и G2, а также нуклеокапсидный (N) вирусный белок, но роль каждого из указанных антигенов в индукции защитного иммунитета против ГЛПС до сих пор не уточнена. Белок N хантавирусов является основным иммунным антигеном при ГЛПС, индуцируя ранний долговременный иммунный ответ [27]. Однако N-специфические антитела не обладают нейтрализующей активностью [20]. Тем не менее в ряде работ было показано, что пассивный перенос N-специфических антител, иммунизация рекомбинантным белком N вируса Хантаан, синтезированным в культуре клеток насекомых, инфицированных бакуловирусом, а также химерными частицами вируса гепатита В, несущими концевой аминокислотный участок белка N вируса серотипа Пуумала, частично защищали иммунизированных животных от последующего заражения патогенным хантавирусом [23, 26]. Вирусные гликопротеины являются основными индукторами защитного гуморального иммунного ответа при ГЛПС: пассивный перенос нейтрализующих G1- и G2-специфических антител способен защитить лабораторных животных от хантавирусной инфекции [23].

В последние годы активно проводятся эксперименты по ДНК-иммунизации животных плазмидными конструкциями, несущими структурные гены различных патогенных хантавирусов.

Наиболее длительная и продолжающаяся в настоящее время серия экспериментов по созданию прототипов ДНК-вакцин для профилактики и лечения ГЛПС была начата J.W. Hooper et al. [11]. В первоначальном исследовании иммунизация мышей и хомяков плазмидой pWRG/SEO-M, несущей ген полипротеина вируса Сеул, индуцировала у животных синтез нейтрализующих G1- и O2-специфических антител и защищала их от заражения вирусами Сеул и Хантаан. В то же время плазида pWRG/-S, несущая ген нуклеокапсидного белка вируса Сеул, оказалась неиммуногенной для животных.

В последующих работах исследовалась эффективность ДНК-иммунизации лабораторных животных плазмидами, на основе ранее использованного вектора pWRG, несущего гены гликопротеинов хантавирусов, вызывающих ГЛПС и геморрагическую

лихорадку с легочным синдромом: Сеул, Хантаан и серотипа Андес - pWRG/SEO-M, pWRG/HTN-M и pWRG/AND-M соответственно. По данным авторов все конструкции успешно индуцировали длительный гуморальный иммунный ответ у макак-резусов [9,15]. Нейтрализующие G1- и G2-специфические антитела, полученные из сыворотки животных, иммунизированных pWRG/SEO-M и pWRG/HTN-M, обладали перекрестной реактивностью к вирусу серотипа Добрава, но таковая отсутствовала в отношении вируса Пуумала. Эти данные находятся в полном соответствии с результатами исследований по перекрестной реактивности антител из сыворотки больных, инфицированных вирусами Сеул, Хантаан, Добрава, Пуумала [7]. В ряде экспериментов было показано, что пассивная иммунизация хомячков, зараженных вирусом Андес, специфическими нейтрализующими G1- и O2-антителами, полученными при ДНК-вакцинации приматов плазмидой pWRG/AND-M, полностью подавляла развитие летальной инфекции или увеличивала продолжительность жизни инфицированных животных [12, 13].

В работе М. Bharadwaj et al. [4] мелкие грызуны *Peromyscus maniculatus* (олений хомячок), иммунизированные плазмидами, кодирующими различные антигенные детерминанты гликопротеинов G1 и G2 и полноразмерный белок N вируса серотипа Син Номбре (Sin Nombre), были защищены с эффективностью 75—100% от заражения соответствующим хантавирусом. В данном исследовании авторы предполагали, что защитный эффект плазмидных ДНК обусловлен индукцией клеточного звена иммунитета, поскольку вирусспецифические антитела в иммунизированных животных не обладали нейтрализующей активностью.

В работе G. Woo et al. [29] из Южной Кореи показано, что введение плазмиды, несущей ген белка N вируса Хантаан, лабораторным мышам (линия C57BL/6) индуцировала у последних гуморальный ответ и образование N-специфических CD8⁺ клеток, в том числе N-CD8⁺ клеток памяти. Таким образом, заражение иммунизированных животных рекомбинантным вирусом, экспрессирующим белок N вируса Хантаан, приводило к формированию устойчивого CD8⁺ ответа против него.

Роль белка N в формировании защитного иммунного ответа на хантавирусную инфекцию не ясна. При иммунизации животных ДНК-конструкциями, кодирующими данный белок, был отмечен протективный эффект в отношении некоторых хантавирусов и показана индукция Т-клеточного ответа, хотя, как уже упоминалось, не происходило формирования защитного гуморального ответа. Однако в работе G. Bucht et al. [5] было отмечено, что плазмиды, содержащие ген нуклеокапсидного белка N, не обладают в полной мере защитной активностью при заражении животных диким штаммом вируса Пуумала (серотип Казань).

Как уже упоминалось, существуют подходы, позволяющие повысить эффективность ДНК-вакцина-

ции. В вышеупомянутой работе G. Bucht et al. [5] было показано, что иммунизация грызунов ДНК-конструкцией, кодирующей секретируемую форму белка N вируса серотипа Пуумала, защищала часть животных от заражения соответствующим хантавирусом в отличие от мышей, иммунизированных конструкциями, кодирующими трансмембранную и внеклеточные формы N-белка, которые оказались совершенно неэффективными. В исследовании J. Li et al. [16] показано использование белка теплового шока HSP70 в качестве адъюванта для ДНК-вакцины. Введение мышам плазмиды, экспрессирующей гены белка HSP70 и белка N вируса Хантаан, значительно усилило специфический гуморальный и клеточный ответ в сравнении с иммунизацией ДНК-конструкцией, содержащей только S-сегмент хантавируса. Усиление иммуногенности ДНК плазмиды, содержащей ген белка N, было достигнуто при совместном ее применении с плазмидой, экспрессирующей ген интерлейкина-12, в экспериментах на лабораторных мышках линии BALB/c [30].

Таким образом, исходя из анализа имеющейся литературы, можно заключить, что ДНК-вакцинация лабораторных животных (преимущественно мелких грызунов) конструкциями, кодирующими структурные гены патогенных хантавирусов, приводит к индукции как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Однако эти результаты должны найти всестороннее подтверждение в экспериментах с привлечением высших животных, в том числе и приматов, для того чтобы служить основанием для осуществления проектов по созданию ДНК-вакцин против хантавирусных инфекций. Генетически неоднородные популяции людей являются весьма сложным объектом и при разработке обычных вакцин вследствие гендерных и возрастных различий, а результативность вакцинации часто оказывается ниже ожидаемой. Большое число последовательных этапов реализации генетической информации, содержащейся в ДНК рекомбинантной плазмиды, может привести к возрастанию роли индивидуальных особенностей конкретного организма при индукции иммунного ответа на ДНК-вакцинацию. А опасность таких последствий, как злокачественная трансформация, индукция апоптоза, аутоиммунные реакции, потенциально связанных с введением чужеродной ДНК в клетку, сдерживает оптимизм в отношении разработки и широкого применения ДНК-вакцин в ближайшие десятилетия.

Литература

1. Дебабов В. Г. // *Молекуляр. биол.* — 1997. — Т. 31. — С. 209-215.
2. Ткаченко Е. А., Окулова Н. М., Юничева Ю. В. и др. // *Вопр. вирусол.* - 2005. - Т. 50, № 3. - С. 14-19.
3. Babiuk I., Pontarollo R., Babiuk S. et al. // *Vaccine.* — 2003. - Vol. 21. - P. 649-648.
4. Bharadwaj M., Mirowsky K., Hy C. et al. // *J. Gen. Virol.* - 2002. - Vol. 83. - P. 1745-1751.

5. Bucht G., Sjolander K., Eriksson S. et al. // *Vaccine*. — 2001. — Vol. 19. — P. 3820-3829.
6. Cho H., Howard C., Lee H. // *Intervirology*. — 2002. — Vol. 24. — P. 328-333.
7. Chu Y., Jennings G., Schmaljohn C. et al. // *J. Infect. Dis.* — 1995. — Vol. 172. — P. 1581-1584.
8. Coelho-Castelo A., Trombone A., Rosada R. et al. // *Genet. Vaccines Therapy*. — 2006. — Vol. 4, No. 1. — P. 1-10.
9. Custer D., Tompson E., Schmaljohn C. et al. // *J. Virol.* — 2003. — Vol. 77. — P. 9894-9905.
10. Donnelly J., Ulmer J., Shiver J., et al. // *Annu. Rev. Immunol.* — 1997. — Vol. 15. — P. 617-648.
11. Hooper J., Kamrud K., Eigh F., et al. // *Virology*. — 1999. — Vol. 255. — P. 269-278.
12. Hooper J., Custer D., Smith J. et al. // *Virology*. — 2006. — Vol. 347. — P. 208-216.
13. Hooper J.W., Ferro A.M., Wahl-Jensen V. // *J. Virol.* — 2008. — Vol. 82. — P. 1332-1338.
14. Ivory C., Chadee K. // *Genet. Vaccines Ther.* — 2004. — Vol. 2. — P. 17-45.
15. Kamrud K., Hooper J., Eigh F. et al. // *Virology*. — 1999. — Vol. 2634. — P. 209-219.
16. Li J., Hy Z., Li K et al. // *Vaccine*. — 2007. — Vol. 25. — P. 239-252.
17. Liu L., Zhou X., Liu H. et al. // *Immunology*. — 2005. — Vol. 225. — P. 223-230.
18. Luckay A., Maninder K.S., Kjekken R.S. et al. // *J. Virol.* — 2007. — Vol. 81. — P. 5257-5269.
19. Mwangi W., Brown W., Splitter G. et al. // *Clin. Vaccine Immunol.* — 2007. — Vol. 14. — P. 304-311.
20. Nicacio C., Sallberg M., Hultgren C et al. // *J. Gen. Virol.* — 2001. — Vol. 82. — P. 129-138.
21. O'Hagan D., Singh M., Dong C et al. // *Vaccine*. — 2004. — Vol. 23, No. 5. — P. 672-680.
22. Robinson H.L. // *Vaccine* — 1997. — Vol. 15, No. 8. — P. 785-787.
23. Schmaljohn C., Chu Y., Schmaljohn A. et al. // *J. Virol.* — 1990. — Vol. 64. — P. 3162-3170.
24. Schmaljohn C, Hjelle B. // *Emerg. Infect. Dis.* — 1997. — Vol. 3, No. 2. — P. 95-104.
25. Tang D. C., Devit M., Jonston S. A. // *Nature*. — 1992. — Vol. 356. — P. 152-154.
26. Ulrich R., Lundkvist A., Meisel H. et al. // *Vaccine*. — 1998. — Vol. 16. — P. 272-280.
27. Vapalahti O., Kallio-Kokko H., Narvanen A. et al. // *J. Med. Virol.* — 1995. — Vol. 46. — P. 293-303.
28. Wolff J.A., Malone R. W., Williams P. et al. // *Science*. — 1990. — Vol. 247. — P. 1465-1468.
29. Woo G., Chun E.-Y., Kim K. // *J. Microbiol.* — 2005. — Vol. 43. — P. 537-545.
30. Zheng L., Mou L., Lin S. et al. // *Chin. Med. J.* — 2005. — Vol. 118, No. 4. — P. 313-319.

Поступила в редакцию 14.05.2008.

PERSPECTIVES OF DNA-VACCINES APPLICATION FOR HANTAVIRAL INFECTIONS PREVENTION

O.V.Chubukova, Yu.M.Nikonorov

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences

Summary — DNA-vaccination methods are based on the introduction of plasmid DNA encoding the pathogen's protein to organism. This approach allows obtaining the complete immune response to different bacterial and viral antigens. At the review, perspective is considering of DNA-vaccine creation on the base of HFRS-exciting structural genes, and problems following such a vaccines creation are emphasized.

Keywords: hantaviruses, DNA-vaccine, immuneresponse.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 3, p. 37-40.

УДК 616.981.455+616.986.7+578.833.29](571.63)

А.В. Алленов¹, В.П. Борзов¹, В.Н. Краснощеков¹, Н.А. Боровская², Т.В. Кушнарева³, В.Ю. Киряков⁴

¹ Приморская противочумная станция Роспотребнадзора (г. Владивосток), ² Владивостокский государственный медицинский университет, ³ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Владивосток), ⁴ Управление Роспотребнадзора по Приморскому краю (г. Владивосток)

СОЧЕТАННОСТЬ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ТУЛЯРЕМИИ, ЛЕПТОСПИРОЗА И ХАНТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ЭКОСИСТЕМАХ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

Ключевые слова: туляремия, лептоспироз, хантавирусы, сочетанные очаги.

Представлены данные о сочетаемости природных очагов туляремии, лептоспироза и хантавирусной инфекции и дана их характеристика. По ландшафтно-географическим характеристикам очаги принадлежат к пойменно-болотному и лугополевому типам. Циркуляцию возбудителей инфекций обеспечивают в основном мышевидные грызуны двух видов — полевая мышь и дальневосточная полевка. Наличие всех трех нозологических форм чаще встречается в пойменно-болотном типе очагов и реже — в лугополевом.

Существование сочетанных очагов природно-очаговых инфекций установлено в Приморском крае в 70-х годах прошлого века при проведении эпизоото-

логического обследования на туляремию. В процессе изучения природных очагов туляремии использовался комплексный подход, направленный на установление наличия возбудителей других инфекций, таких как клещевой энцефалит, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), риккетсиоз, листериоз, лептоспирозы, иерсиниоз, клещевой боррелиоз и пастереллез [4]. В результате исследований, проведенных в последние годы в Приморском крае, было получено подтверждение существования и функционирования на его территории природных очагов туляремии, лептоспироза и хантавирусной инфекции,