

БИОТЕХНОЛОГИЯ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ: ВАКЦИНЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ (ОБЗОР)

Л.Л. Мякинкова, Л.Н. Губченко, А.В. Маклецкая

В статье отражены новейшие тенденции в области изучения вопросов создания вакцин и вакцинопрофилактики на базе достижений геномики и протеомики с учетом новых идей иммунологии.

Ключевые слова: вакцины, вакцинопрофилактика, генная инженерия, геномика, иммунология, протеомика.

Одним из главных критериев процветания страны является средняя продолжительность жизни ее населения. В последнее время наблюдается преждевременная смертность: от сердечно-сосудистых заболеваний, злокачественных новообразований, нездорового образа жизни, неблагоприятных воздействий окружающей среды. Кроме того, причиной более чем 30 % смертей во всем мире являются инфекционные заболевания.

Особенность проблемы инфекционных заболеваний состоит в глобальном распространении их по всему миру. Наиболее эффективным средством снижения заболеваемости инфекционными болезнями со времен открытия Пастера и до наших дней является вакцинация. Она способствует формированию у реципиента более или менее стойкого иммунитета к патогенным микроорганизмам, защищая его от инфекции.

Более ста лет ученые всего мира разрабатывают и совершенствуют вакцины, создающие иммунитет против возбудителей инфекционных заболеваний. С помощью вакцин спасены миллионы жизней, остановлены эпидемии и пандемии.

С появлением вакцин, антибиотиков и внедрением мер профилактики удалось взять под контроль такие инфекционные болезни, как туберкулез, оспа, холера, брюшной тиф, бубонная чума и полиомиелит. Однако защитные меры со временем становятся неэффективными, и возникают новые вспышки заболеваний. Поэтому в последние десятилетия это заставило совершенно по-новому осмыслить эту проблему. Человечество столкнулось с так называемыми «возникающими» и «повторно возникающими» инфекциями. Под первым ВОЗ понимает ранее неизвестные, или известные, но охватывающие новые территории и типы популяций, где они прежде не регистрировались. Под вторым – известные инфекции, уровень заболевания которыми вновь возрастает.

Основными причинами проявления таких инфекций считают: ослабление контроля над ними, повышение миграции населения, увеличение числа людей с ослабленным иммунитетом, а также изменения окружающей среды.

При вирусных заболеваниях важную роль играют две ветви иммунного ответа: гуморальный и клеточный. Гуморальный ответ (антитела) направлен на внеклеточную стадию жизненного цикла паразита и препятствует проникновению вируса в клетку. Клеточный ответ направлен на внутриклеточную стадию, цитотоксические лимфоциты-киллеры распознают клетки, зараженные вирусом, и убивают их, препятствуя появлению нового зрелого вирусного потомства.

Цельновирионные вакцины. Вирусы столь малы и просто устроены, что могут размножаться, только используя многочисленные макромолекулы клетки, необходимые для биосинтеза белков и нуклеиновых кислот. Поэтому вирусы осуществляют жизнедеятельность исключительно внутри живых клеток. Хозяевами могут быть как одноклеточные (например, бактерии), так и многоклеточные организмы (например, животные или растения). Вирусные частицы (вирионы) многообразны по своей морфологии, но все они обязательно содержат нуклеиновую кислоту (ДНК или РНК), окруженную чехлом из большого числа белковых молекул. У некоторых видов вирусов частицы покрыты дополнительными оболочками, содержащими не только белки, но и липиды. Поверхностные белки вирусов обычно обладают выра-

женными иммуногенными свойствами, то есть вызывают формирование иммунного ответа в зараженном организме.

При попадании вируса в организм и развитии инфекционного заболевания в иммунной системе индуцируются процессы, направленные на инактивацию свободного вируса и уничтожение зараженных клеток, способных выделять инфекционный вирус. Свободный вирус инактивируется прежде всего в результате взаимодействия с антителами, специфично связывающимися с поверхностными антигенами вирусных частиц. За выработку антител (иммуноглобулинов) отвечают В-клетки иммунной системы организма (В-лимфоциты). Следует отметить, что в ответ на каждый антиген активируется размножение строго специфичных В-лимфоцитов, которые синтезируют антитела, осуществляющие связывание этого антигена и выведение его из организма. Такой иммунитет часто называют гуморальным. Важнейшим механизмом в уничтожении зараженных вирусом клеток (на поверхности которых представлены некоторые антигены вируса) является активация размножения специфичных Т-лимфоцитов, лизирующих (разрушающих) эти клетки. Данный тип ответа иммунной системы называют *клеточным иммунитетом*. В результате прошедшей инфекции в организме переболевшего животного сохраняется небольшое количество специфичных (сенсibilизированных) В- и Т-лимфоцитов, которые при повторной инфекции таким же вирусом могут быстро размножаться и обеспечивать устойчивость организма к данному патогену. Такое состояние организма также называют *иммунологической памятью*.

Первоначальная устойчивость к повторной инфекции обусловлена, главным образом, воздействием специфичных антител на свободный вирус. С момента начала развития инфекции (заражения клеток и размножения в них вируса) важную роль начинают играть иммунные механизмы, направленные на лизис зараженных клеток и тем самым ограничивающие размножение вируса. Окончанию инфекционного процесса содействуют опять же антитела, влияющие на свободный вирус. Приведенное описание очень схематично. До сих пор нет четкой ясности относительно вклада разных механизмов иммунитета в устойчивость организма к инфекции. Поэтому эффективность развития иммунного ответа при использовании того или иного подхода определяется только экспериментально, сначала на лабораторных животных и лишь затем на людях. В настоящее время ясно, что для эффективной иммунопрофилактики необходима стимуляция возможно большего числа иммунных механизмов в правильном соотношении.

Иммунный организм или совершенно устойчив к инфицирующему микроорганизму, или обуславливает протекание заболевания в легкой форме. Поэтому большое внимание медицина и ветеринария уделяют разработке методов эффективной и безопасной иммунизации (вакцинации) людей и домашних животных. Существуют разные типы вакцин, каждый из которых имеет определенные достоинства и недостатки. Коротко охарактеризуем эти типы.

В качестве живых вирусных вакцин обычно используют так называемые *аттенуированные* (ослабленные) варианты вирусов, которые являются утратившими большинство свойств патогенности (мутантами исходно патогенных штаммов). В редких случаях удается найти близкородственный слабопатогенный вирус, вакцинация которым обеспечивает иммунную защиту от другого опасного вируса (наиболее яркий пример: предложенная Дженнером вакцинация вирусом оспы коров против натуральной оспы). Главным преимуществом живых вакцин является то, что они активируют все компоненты иммунной системы, вызывая сбалансированный иммунный ответ. Кроме того, такие вакцины относительно дешевы, так как для иммунизации требуется небольшая доза вируса, поскольку он размножается в зараженном организме.

Недостаток живых вакцин заключается в том, что они обычно сохраняют некоторый уровень остаточной патогенности, хотя он может быть и очень низким. Тем не менее, у детей и лиц с дефектной иммунной системой они могут в некоторых случаях вызывать тяжелые формы заболевания. Одной из проблем при массовом производстве аттенуированных вакцин является их возможная генетическая нестабильность, приводящая к возвращению свойств

патогенности. Поэтому партии вакцин необходимо тщательно проверять на лабораторных животных. Кроме того, для живых вакцин серьезной проблемой может быть их биологическая нестабильность при хранении и использовании в практической медицине (или ветеринарии). Более того, как показывает опыт, иногда живые вакцины в процессе наработки на культурах клеток могут загрязняться другими вирусами, поэтому требуется строгий контроль качества получаемых препаратов вакцин.

Трудности, возникающие при получении и использовании живых вакцин, удается преодолеть в случае использования инактивированных вакцин, которые представляют собой препарат патогенного вируса, инактивированного (убитого) формальдегидом, бета-пропиолактоном или каким-либо другим химическим соединением. Инактивация направлена на вирусный геном и по возможности не должна затрагивать белковый каркас вирусной частицы. В данном варианте риск заражения при вакцинации практически отсутствует, не требуется проводить сложную, длительную и не всегда удачно завершающуюся работу по получению аттенуированных штаммов. Инактивированные вакцины, как правило, проще сохранять.

Основным недостатком инактивированных вакцин является то, что они уступают аттенуированным живым вирусам в отношении индукции Т-клеточного иммунитета. Кроме того, для эффективной индукции В-клеточного (гуморального) иммунитета необходимо вводить относительно большие дозы инактивированной вакцины с определенной периодичностью, что может приводить с течением времени к аллергизации организма. При инактивации вируса часть антигенов может полностью или частично разрушаться, что также снижает качество вакцины. Следует отметить, что при препаративной наработке патогенных вирусов, предназначенных для получения инактивированных вакцин, предъявляются повышенные требования по обеспечению безопасности как самого персонала, так и окружающей среды, то есть требуются дорогостоящие, специально оборудованные помещения.

Вакцины на основе вирусных антигенов. Как отмечено выше, живые и инактивированные вакцины могут иметь определенные недостатки, в частности, патогенное или аллергенное воздействие на некоторых вакцинируемых. Поэтому ученые пытаются разрабатывать более безопасные варианты противовирусных вакцин. Наиболее продуктивным при этом является направление исследований по использованию очищенных вирусных белков. Такие вакцины называют *субъединичными*. Эти вакцины обычно являются набором протективных вирионных белков или отдельным поверхностным протективным белком, выделенным из препарата вирионов (вирусных частиц). Под протективной активностью антигена понимается его способность обеспечить развитие устойчивости иммунизируемого организма к последующему инфицированию данным вирусом. Иммуногенность, или способность вызывать в организме образование антител, зависит от наличия на поверхности молекулы белка так называемых эпитопов (антигенных детерминант), образуемых обычно шестью-восемью аминокислотными остатками и обладающих наибольшим сродством к связывающей области специфического иммуноглобулина (антитела). Обычно отдельный белок имеет несколько разных эпитопов. При этом каждый эпитоп в составе молекулы белка узнается определенными лимфоцитами, вырабатывающими антитела только против данного эпитопа. Таким образом, против чужеродного белка иммунная система обычно создает несколько разных типов иммуноглобулинов.

Антигенные детерминанты вирусных частиц могут быть трех типов:

- 1) эпитопы, являющиеся непрерывными участками полипептидной цепи;
- 2) конформационные эпитопы, представляющие собой пространственно сближенные отдельные участки полипептидной цепи;
- 3) конформационные эпитопы, составленные аминокислотными остатками двух или более различных белков, объединенных в макроструктуру в составе вирусной частицы. Наличие указанных конформационных детерминант в некоторых случаях приводит к тому, что иммуногенные свойства вирусных белков определяются их третичной и четвертичной структурой.

В том случае, когда главная (наиболее иммуногенная) антигенная детерминанта протективного вирусного белка представлена непрерывной аминокислотной последовательностью, можно осуществить ее химический синтез и полученным синтетическим пептидом провести иммунизацию. Выполненные многочисленные эксперименты в данном направлении показали, что в некоторых случаях пептидные вакцины обеспечивают специфическую защиту организма от определенного вируса.

Хотя подход с использованием синтетических пептидов обладает значительными потенциальными возможностями, имеются и существенные сложности, обусловленные, прежде всего, слабой антигенной активностью большинства индивидуальных пептидов вследствие их малого размера.

Усиления иммуногенности таких пептидов часто удается добиться после связывания их с высокомолекулярными носителями (например, с белком, называемым *бычьим сывороточным альбумином*). Однако получение таких вакцин трудоемко и дорого, что мало приемлемо при массовой вакцинации.

Для некоторых вирусов не удается подобрать условия их размножения на культурах клеток или в организме лабораторных животных и, как следствие этого, невозможно получать даже инактивированную вакцину. Ярким примером такого случая является вирус гепатита В человека, для которого не найдено культур клеток млекопитающих, обеспечивающих его наработку. Кроме человека, к данному вирусу чувствительны только обезьяны шимпанзе, которые очень дороги и редки. Поэтому данный вирус одним из первых привлек внимание исследователей, работающих в области генетической инженерии. Встал вопрос, можно ли методами генетической инженерии создать молекулярную вакцину против заболевания гепатитом В. Многие лаборатории мира взялись за решение этой проблемы, что позволило добиться положительного результата.

В 1960-е гг. было обнаружено, что в крови больных гепатитом В, кроме вирусных частиц (вирионов) диаметром 42 нм, находятся небольшие сферические частицы со средним размером 22 нм в диаметре. Оказалось, что частицы 22 нм состоят из молекул белка оболочки вириона, который назван *поверхностным антигеном вируса гепатита В* (HBsAg), и обладают высокими антигенными и протективными свойствами. В 1982 г. было обнаружено, что при эффективной экспрессии искусственного гена поверхностного антигена вируса гепатита В в клетках дрожжей происходит самосборка изометрических частиц диаметром 22 нм из вирусного белка. Частицы 22 нм HBsAg, полученные методом генетической инженерии, по структуре и иммуногенным свойствам практически не отличаются от природных. Мономерная же форма HBsAg обладает значительно меньшей иммуногенной активностью.

В 1984 г. в эксперименте на добровольцах было продемонстрировано, что получаемая генно-инженерная молекулярная вакцина (22 нм-частицы) против гепатита В вызывает в организме человека эффективное образование вируснейтрализующих антител. Данная «дрожжевая» молекулярная вакцина явилась первой генно-инженерной вакциной, которая была разрешена для использования в медицине. До сих пор она обеспечивает единственно надежный способ массовой защиты от гепатита В.

В связи с низкой иммуногенностью индивидуальных вирусных белков возникла идея создания надмолекулярных вирусоподобных белковых структур, в которых многократно представлены те или иные антигенные детерминанты. При этом необходимо наличие белка-носителя, который при определенных условиях способен осуществлять самосборку вирусоподобных частиц. При встраивании кодирующей последовательности антигенной детерминанты изучаемого вируса в заранее выбранный район гена белка-носителя можно надеяться на то, что детерминируемый таким гибридным геном химерный белок будет способен по-прежнему формировать надмолекулярные структуры и экспонировать на их поверхности чужеродные антигенные детерминанты. Первый успех в данном направлении исследований, имеющий практическое значение, достигнут исследователем Кларком с соавторами в 1987 г. при использовании в качестве белка-носителя коровьего (сердцевинного) белка вируса гепа-

тита В человека. Данный белок называют *кор-антигеном* (НВсАg). При нормальном развитии вируса гепатита В около 200 молекул НВсАg формируют изометрическую частицу диаметром 28 нм, содержащую вирусный геном и называемую *сердцевинной вириона*.

При введении гена, кодирующего НВсАg в бактериальные клетки кишечной палочки (*Escherichia coli*), оказалось, что в процессе синтеза данный белок способен осуществлять самосборку и формировать без каких-либо дополнительных компонентов вируса сердцевинноподобные частицы, неотличимые по своим иммунологическим и морфологическим признакам от синтезируемых вирусом. Затем был сконструирован гибридный ген, в котором перед началом кодирующей последовательности НВсАg подстроили ген-эквивалент протективной антигенной детерминанты (АД) белка VP1 вируса ящура (19 аминокислотных остатков) так, чтобы синтезировался единый химерный белок с последовательностями НВсАg и белка VP1 вируса ящура (НВсАg /АД). Оказалось, что детерминируемый созданным гибридным геном химерный белок токсичен для бактерии. Поэтому он был синтезирован в культуре клеток почки зеленой африканской мартышки. Химерный белок (НВсАg/АД) формировал сердцевинноподобные частицы НВV, которые очищали от других белков и проверяли на иммуногенность. Выяснилось, что иммуногенность полученных надмолекулярных структур, в которых многократно представлены встроенные эпитопы, приближается к иммуногенности инактивированной вакцины против ящура.

Рассмотренная работа наряду с исследованиями, выполненными позднее, указывает на перспективность создания вирусоподобных комплексов, способных экспонировать на своей поверхности чужеродные антигенные детерминанты, для получения безопасных молекулярных противовирусных вакцин. Тем не менее, важнейшим направлением научных изысканий остаются разработка и совершенствование новых типов живых вакцин, являющихся самыми эффективными, поскольку они индуцируют сбалансированный гуморальный и клеточный иммунный ответ.

Генно-инженерные поливалентные живые вакцины. С появлением в середине 1970-х гг. методов генетической инженерии стала реальной возможностью встройки в геномы вирусов чужеродных генов, направляющих синтез желаемых белков. В 1980 г. проведены первые генно-инженерные эксперименты на вирусе простого герпеса человека, в 1981 – на аденовирусе человека, а в 1982 – на вирусе осповакцины. Возникла идея конструирования гибридных вирусов, способных при заражении человека или животных синтезировать не только свои белки, но и протективные белки других патогенных вирусов, для которых нет эффективных вакцин. Такие гибридные вирусы получили название *живых поливалентных вакцин (поливалентные*, – так как защищают одновременно от двух или более инфекций). Живые вакцины индуцируют не только антительный (гуморальный) иммунный ответ в инфицируемом организме, но и имеющий важное значение для защиты от вирусной инфекции Т-клеточный иммунный ответ. Цитотоксические (разрушающие клетки-мишени, в нашем случае – клетки, инфицированные вирусом) Т-лимфоциты продуцируются только в ответ на антиген, синтезируемый эндогенно в клетках организма, и не продуцируются при введении этого же антигена экзогенно, то есть в составе убитой вакцины или в виде индивидуального белка. Поэтому разработка живых поливалентных противовирусных вакцин открывает новые, ранее недоступные возможности иммунопрофилактики различных инфекционных заболеваний. Вирусы, в геном которых встраивают чужеродные гены, называют *векторными вирусами* или *векторами*. Несомненно, что при создании живых поливалентных вакцин в качестве векторных наиболее целесообразно использовать вирусы, уже применяемые в качестве живых вакцин.

Внимание многих исследователей в последние годы было приковано к вирусу осповакцины, принадлежащему к семейству поксвирусов. Данный вирус возник, по-видимому, в конце прошлого – начале настоящего столетия в процессе проведения массовых вакцинаций против оспы и отбора вариантов вируса (исходно вируса оспы коров), обладающих сниженной реактогенностью (дающих меньший процент осложнений), но обеспечивающих надежную защиту против оспы. Вирус осповакцины отличается от оспы коров, в природе он не

обнаружен, и механизм его появления пока неясен. Различные штаммы вируса осповакцины (ВОВ) были использованы для массовых вакцинаций при выполнении международной программы ликвидации оспы на Земле (1953–1980 гг.). Для ВОВ накоплен огромный опыт использования в медицинской практике в разных климатических зонах. Этим данный вирус очень привлекателен в качестве вектора для создания живых поливалентных вакцин. Однако накопленные данные демонстрируют, что ВОВ реактогенен и в небольшом количестве случаев (0,1–0,2 %) может вызывать осложнения, особенно у детей и лиц с нарушениями иммунной системы. Поэтому после объявления в 1980 г. об искоренении оспы Всемирная организация здравоохранения призвала страны не проводить в дальнейшем противосспенную вакцинацию. В настоящее время такая вакцинация прекращена практически во всем мире.

Тем не менее, именно ВОВ рассматривается многими учеными как наиболее удобный вектор для создания вирусных живых поливалентных вакцин. Обнаружено, что нарушение определенных генов ВОВ приводит к снижению его реактогенности (вирулентности). В многочисленных работах на лабораторных животных продемонстрировано успешное использование ВОВ в качестве вектора для получения эффективных живых вакцин против различных вирусных инфекций.

Важным направлением исследований является создание живых вакцин для домашних и диких животных. В этом плане ВОВ имеет большие перспективы для использования в качестве вектора, так как он способен размножаться в организме не только человека, но и многих млекопитающих. Важным достоинством ВОВ и других поксвирусов также является их высокая устойчивость (по сравнению с вирусами других семейств) к воздействиям внешних физических факторов.

Впечатляющие результаты получены при использовании гибридного ВОВ, экспрессирующего поверхностный гликопротеин G вируса бешенства. Во многих европейских странах и Канаде основным природным источником вируса бешенства являются лисы, от которых заражаются домашние животные и человек. В США главными природными носителями вируса бешенства являются еноты и скунсы. Лабораторные эксперименты показали, что при введении лисам вместе с кормом гибридного ВОВ происходят вакцинирование животных и выработка надежного иммунного ответа против бешенства (а также против ортопоксвирусов). Исходя из этих результатов, в Швейцарии и некоторых других странах провели масштабные эксперименты, которые состояли в том, что в местах обитания лис разбрасывали пищевые приманки, содержащие живой гибридный вирус осповакцины. В результате значительно сократилось число лис, зараженных вирусом бешенства, что привело к радикальному снижению в этих районах заболеваемости бешенством домашних животных и человека.

В последние годы большое внимание уделяется разработке ветеринарных живых вакцин на основе таких поксвирусов, как вирус оспы птиц для птицеводства и вирус болезни Орф для овцеводства. Полученные результаты указывают на большую перспективность развития данного направления исследований и позволят существенно повысить продуктивность животноводства и птицеводства.

ДНК-вакцины. При создании живых поливалентных вирусных вакцин одной из основных проблем является преодоление возможных побочных эффектов вакцинации. Во-первых, необходимо свести к минимуму реактогенность получаемого гибридного вируса. Во-вторых, при вакцинации гибридным вирусом формируется полноценный иммунный ответ не только на целевой синтезируемый антиген, но и на все антигены векторного вируса. Поэтому повторное использование того же вектора для вакцинации против другого заболевания может быть затруднено.

Преодолеть эти препятствия, возможно, удастся при использовании новейшего подхода к иммунопрофилактике вирусных инфекций, предложенного исследователем Танг с соавторами в 1992 г. Одновременно несколько групп ученых опубликовали в 1993 г. результаты своих работ, подтвердивших перспективность этого нового направления исследований, получившего название *ДНК-вакцины*. Оказалось, что в организм животного можно просто

вводить препарат гибридной плазмиды, содержащей ген протективного вирусного антигена. Происходящий при этом синтез вирусного белка (антигена) приводит к формированию полноценного (гуморального и клеточного) иммунного ответа. Плазида является небольшой кольцевой двухцепочечной молекулой ДНК, размножающейся в бактериальной клетке. С помощью методов генетической инженерии в плазмиду можно встроить необходимый ген (или несколько генов), который затем сможет экспрессироваться в клетках млекопитающих (в том числе и человека). Показано, что при разных способах введения (внутрикожно, внутримышечно, внутривенно) гибридная плазида может проникать в клетки и достаточно долго сохраняться в организме. Целевой белок, кодируемый гибридной плазмидой, продуцируется в клетках, имитируя процесс биосинтеза соответствующего белка при вирусной инфекции. Это приводит к формированию сбалансированного иммунного ответа против изучаемого вируса. ДНК-вакцины могут быть получены в большом количестве, они стабильны и лишены инфекционности. Перспективным направлением является разработка многокомпонентных вакцин, содержащих две или несколько плазмидных форм, которые кодируют разные антигены, цитокины или другие биологически активные молекулы.

К настоящему времени на животных изучено более 40 вакцин против вирусных, бактериальных, грибковых и паразитарных возбудителей (в том числе, против вируса СПИД, гриппа, бешенства, лимфоцитарного хориоменингита, гепатитов В и С, простого герпеса, ВПЧ, а также возбудителей малярии, лейшманиоза, туберкулеза).

Однако в опытах на добровольцах до сих пор удовлетворительного иммунного ответа получено не было. Также при использовании ДНК-вакцин существует несколько неясных моментов: неизвестны сроки, в течение которых клетки организма будут вырабатывать антигенный белок; далеко не все ясно с безопасностью ДНК-вакцин. Необходимо исключить онкогенную опасность. Еще недостаточно изучено, может ли вводимая ДНК встраиваться в геном клетки человека и вызывать риск развития рака. Образование антигена в организме может продолжаться длительное время (до нескольких месяцев), это может привести к развитию различных форм иммуносупрессии и других патологических явлений. Чужеродная ДНК может вызвать образование анти-ДНК-антител, которые способны индуцировать различные формы аутоагрессии и иммунопатологии. Сам образующийся антиген может обладать побочным биологическим действием. Меньше вопросов вызывает использование живых векторов непатогенных микроорганизмов (осповакцина, вирусы птичьей оспы, аденовирусы), продуцирующих вакцинный антиген. К настоящему времени создано около 60 таких вакцин, 40 из них проходят испытания.

Потребуется еще некоторое время, прежде чем можно будет определенно сказать, применима ли ДНК-вакцинация для человека. Во всяком случае, уже сейчас ясно, что в последние десять лет генетическая инженерия внесла огромный вклад в развитие новых подходов к иммунопрофилактике инфекционных заболеваний.

Синтетические пептидные вакцины. Идея использования синтетических пептидов в качестве вакцин родилась при изучении клеточных и молекулярных механизмов развития иммунитета.

В 1974 г. М. Села впервые описал искусственно полученный пептид, вызывающий образование антител к белку лизоциму. При определенных условиях синтетические пептиды могут обладать такими же свойствами, как и естественные антигены, выделенные из возбудителей инфекционных заболеваний. Синтезированы и испытаны полисахариды, аналогичные естественным антигенам, например, сальмонеллезным полисахаридам. Молекула синтетических вакцин может содержать разнородные участки (эпитопы), которые способны формировать иммунитет к разным видам инфекций.

Экспериментальные синтетические вакцины получены против дифтерии, холеры, стрептококковой инфекции, гепатита В, гриппа, ящура, клещевого энцефалита, против пневмококковой и сальмонеллезной инфекций.

У синтетических пептидов нет недостатков, характерных для живых вакцин (возврат патогенности, остаточная вирулентность, неполная инактивация и т. п.). Синтетические вакцины обладают высокой степенью стандартности, слабой реактогенностью, они безопасны. В будущем синтетические пептидные вакцины могут стать высокоспецифичной, относительно недорогой, безопасной и эффективной альтернативой традиционным вакцинам, хотя для этого необходимо провести еще немало исследований.

Антиидиотипические вакцины. Идиотипом называют структуру, характеризующую индивидуальные антигенные свойства молекулы антитела и клеточных рецепторов. Антиидиотипические антитела являются «зеркальным отражением» антигена и поэтому способны вызывать образование антител, реагирующих с антигеном.

Экспериментальные вакцины на основе идиотипов получены к многочисленным возбудителям вирусных, бактериальных и паразитарных заболеваний. Было показано, что их введение вызывает образование, как антител, так и клеток иммунологической памяти. Вакцины безопасны, так как идиотипы являются естественными эндогенными регуляторами иммунного ответа. Производство таких вакцин удобно в тех случаях, когда трудно получить достаточное количество антигена и он слабо иммуногенен.

При всем этом, надежда, которую возлагали на антиидиотипические вакцины, пока не оправдалась, интерес к вакцинам данного типа падает, так как с помощью них не удается достичь необходимого уровня нейтрализующих антител и напряженного иммунитета.

Съедобные вакцины (растительные вакцины). Революционным направлением в современной вакцинологии является разработка вакцин на основе трансгенных растений, в геном которых был встроен соответствующий фрагмент генома патогенного микроорганизма.

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о широкой перспективе в разработке и практическом использовании таких вакцин. Оральный способ иммунизации является самым безопасным и доступным. Ассортимент пищевых источников растительных вакцин не ограничен. Немаловажное значение имеет высокая экономичность растительных вакцин с учетом, что по прогнозам многих специалистов стоимость существующих вакцин будет возрастать, а цена многих вновь разрабатываемых вакцин будет выше стоимости применяемых в практике.

Первая такая вакцина была получена в 1992 г.: трансгенное растение табака стало продуцировать «австралийский» антиген. Полученный из растений и частично очищенный антиген, введенный мышам, вызывает мощный иммунный ответ, подобно вакцине против гепатита В.

В 1998 г. с помощью картофеля, продуцирующего В-субъединицу холерного анатоксина, была получена выраженная защита у поедавших его мышей при заражении их холерой. Аналогичная вакцина против кори была получена на табаке.

В том же 1998 г. 10 из 11 добровольцев, получивших по 100 граммов сырого картофеля, продуцирующего антигены энтеропатогенной кишечной палочки, начали вырабатывать в слизистой кишечника антитела к этому возбудителю. Сейчас испытываются «картофельные» вакцины к вирусу Ньюарк (возбудителю диареи) и гепатиту В с обнадеживающими результатами. На животных проверяется действие вакцин против бешенства, выращенных на помидорах. С учетом необходимости использования этих «вакцинных продуктов» в сыром виде, ведутся исследования по выращиванию вакцин на основе растений, которые не требуют приготовления, например, на бананах.

В настоящее время по разработке «съедобных вакцин» существует немало опасений и сомнений в отношении иммунного ответа на пищевые продукты, сохранности антигена в кислой среде желудка, времени «созревания» вакцин, способности переносить хранение, оптимального дозирования.

Новые комплексные вакцины. Одной из актуальных проблем современной вакцинологии является разработка комплексных вакцин, с помощью которых возможна иммунизация против нескольких инфекций. Вакцинировать против всех инфекций с помощью одной инъекции препарата — требование к идеальной вакцине.

К трудностям создания многокомпонентных вакцин относятся: физико-химическая несовместимость некоторых антигенов, стабилизаторов, консервантов, адъювантов и пр.; недостаточная стабильность многокомпонентных комбинаций из антигенов; различная длительность приобретенного иммунитета к отдельным компонентам комплексной вакцины; сроки ревакцинаций.

В исследованиях на людях показана возможность создания активных комбинированных вакцин, состоящих из инактивированных и живых компонентов. Они могут быть сгруппированы в соответствии с совместимостью антигенов и вакцинных штаммов. Более вероятно, что в недалеком будущем в практической вакцинологии будут использоваться две основные многокомпонентные вакцины: одна живая, другая химическая (инактивированная).

Микрокапсулированные вакцины. Для получения таких вакцин используются биodeградирующие микросферы, которые, с одной стороны, предохраняют антиген от вредного влияния окружающей среды, а с другой, распадаются и освобождают антиген в заданное время.

Микрокапсулы состоят из нетоксичных полимеров лактида или гликолида, или их сополимеров. Микросферы могут быть разной величины, максимальный диаметр обычно не превышает 10 микрон. Вакцины можно вводить любым способом (парентерально, орально, интраназально и пр.).

В экспериментальных условиях испытано несколько десятков таких вакцин. С помощью микросфер можно проводить комплексную вакцинацию против нескольких инфекций одновременно: каждая капсула может содержать несколько антигенов, а для иммунизации можно брать смесь различных микрокапсул. Таким образом, микрокапсулирование позволяет значительно сократить количество инъекций при вакцинации.

Вакцины-леденцы. Открываются новые перспективы стабильности вакцин и упрощения их транспортировки и хранения. Это становится возможным благодаря «леденцовой технологии». Речь идет о способности сахара трегалозы сохранять живыми клетки при крайней степени обезвоживания. Трегалоза, как и другие сахара, встречается в тканях многих организмов – от грибов до млекопитающих. Ее особенно много в растениях пустынь. Трегалоза обладает способностью при охлаждении насыщенного раствора постепенно переходить в состояние «леденца», которое иммобилизует, защищает и сохраняет белковые молекулы. При контакте с водой леденец быстро тает, высвобождая белки.

Использование подобной технологии для сохранения вакцин позволит, прежде всего, сократить расходы на их транспортировку и хранение, повысив термостабильность. Но с ее помощью можно создать и новые их формы, например, вакцинные иглы, которые, будучи введены в кожу, будут растворяться и высвобождать вакцину с определенной скоростью. Возможно приготовление такой вакцины в виде быстрорастворимого порошка, содержащего вакцину для ингаляции или для инъекции в кожу.

Чрезкожная иммунизация. Это еще одно новшество в производстве вакцин. Было показано, что кожные пластыри, пропитанные В-субъединицей холерного токсина, не вызывают токсического эффекта. В то же время, они активируют антиген-презентирующие клетки, находящиеся в избытке в коже. При этом развивается мощный иммунный ответ как антигеновый, так и клеточный.

Если в пластыре холерный токсин смешать с другим вакцинным антигеном, то иммунный ответ развивается и к нему. Такой путь испытывается для иммунизации против столбняка, бешенства, дифтерии, гриппа.

Проблемы и перспективы разработки вакцины против ВИЧ/СПИДа. Первые случаи СПИДа были описаны в 1981 г. С тех пор, несмотря на санитарно-просветительские меры и появление лекарственных препаратов, эпидемия ВИЧ/СПИДа продолжает распространяться. Сейчас ее скорость составляет 16 000 новых случаев инфекции ежедневно. Возбудитель инфекции – вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) был идентифицирован в 1984 г., а вскоре после этого был полностью расшифрован геном вируса и созданы тесты для надежной лабораторной диагностики инфекции. В то время казалось, что удастся быстро создать и надеж-

ное лекарство или вакцину против СПИДа. Но эта задача оказалась чрезвычайно трудной, прежде всего, из-за самой природы вируса и вызываемого им заболевания.

Как известно, исходом многих других инфекций может быть либо гибель организма-хозяина, либо выздоровление с сохранением более или менее стойкого иммунитета. Этот факт лежит в основе классических пастеровских вакцин. Но при СПИДе выздоровление не описано, а редкие случаи благоприятного течения болезни обычно связаны либо с дефектным вирусом, либо с особенностями хозяина (например, дефектной формой клеточного рецептора, с которым связывается вирус, проникая в клетку). Это наводит на мысль о невозможности создания анти-ВИЧ вакцины, и такую точку зрения разделяют многие специалисты в области СПИДа.

Беда в том, что иммунный ответ при ВИЧ-инфекции/СПИДе есть, но он не становится протективным иммунитетом. Как уже сообщалось выше, при вирусных заболеваниях важную роль играют обе ветви иммунного ответа: гуморальный и клеточный. При заражении ВИЧ тоже существует естественный иммунный ответ, он какое-то время сдерживает инфекционный процесс, но не может его остановить. Характерным признаком ВИЧ-инфекции является гиперстимуляция иммунной системы: поликлональная активация, гаммаглобулинемия. Показано, что некоторые антитела против антигенов ВИЧ не только не сдерживают, а усиливают инфекционный процесс. Отсутствие случаев излечения от болезни свидетельствует о том, что биологически вирус оказался сильнее всех наших защитных механизмов, вместе взятых, включая и иммунные механизмы. Следовательно, эффективная вакцина должна работать лучше, чем природные механизмы защиты.

Природа подсказывает нам, как мы должны действовать. Известны примеры продолжительного отсутствия признаков заражения у людей, имевших множественные контакты с ВИЧ-инфицированными половыми партнерами — это группы проституток в Гамбии и Кении. Кроме того, дети ВИЧ-инфицированных матерей в 70–80 % случаев рождаются незараженными. Известны также лица с необычно благоприятным течением инфекции. Один из механизмов устойчивости к передаче ВИЧ половым путем установлен — это мутация в гене, кодирующем хемокиновый рецептор CCR5, являющийся корецептором для проникновения вируса в клетку. Все эти случаи указывают исследователям слабые звенья в атаке ВИЧ на организм и дают основания для осторожного оптимизма разработчикам вакцин против СПИДа.

С 1986 г. в мире разрабатывалось более 400 экспериментальных вакцин, причем 40 из них были уже испытаны. 60 кандидатных вакцин находятся в различных фазах клинических испытаний, а 2 вакцины уже более года проходят испытания на эффективность (последняя III фаза) на нескольких тысячах добровольцев.

Разрабатываемые вакцины перекрывают все возможные варианты представления антигена иммунной системе. Традиционным подходом являются вакцины на основе убитого или живого аттенуированного вируса. Известно, что именно живые вакцины оказались наиболее удачными при других вирусных инфекциях (оспа, полиомиелит), показано также, что живой вирус обеспечивает наилучшую защиту на модели вируса иммунодефицита обезьян (SIV). Но пока ни одна вакцина на основе живого или убитого ВИЧ не продвинулась до клинических испытаний, прежде всего, в связи с сомнениями в безопасности препарата.

Значительная часть разработок посвящена созданию препаратов на основе рекомбинантных технологий. Ее основу составляет создание специальных рекомбинантных генных конструкций, так называемых *экспрессирующих векторов*, получаемых с помощью генно-инженерных манипуляций. Такие конструкции содержат гены, кодирующие один или несколько белков ВИЧ, или их фрагментов, и могут размножаться в клетках бактерий, дрожжей, насекомых или млекопитающих. В результате в этих клетках нарабатываются полипептиды, повторяющие антигены ВИЧ.

Вакцинирующий препарат, полученный с помощью генно-инженерной технологии, бывает двух типов. Первый представляет собой так называемый *субъединичный антиген* — очищен-

ный рекомбинантный белок, который содержит антигены ВИЧ и может использоваться для иммунизации в присутствии или в отсутствие иммуномодуляторов, адъювантов и т.п. Второй вариант — это сама рекомбинантная генная конструкция, которая может быть по-разному представлена иммунной системе: в виде «голой» рекомбинантной ДНК (так называемая *ДНК-вакцина*). В составе непатогенного вируса (например, вируса осповакцины). В составе аттенуированного штамма бактерии (например, сальмонеллы) и т. п. Во всех этих случаях белки, повторяющие антигены ВИЧ, нарабатываются внутри самого иммунизируемого организма. В последнее время большое внимание уделяется комбинированной стратегии, получившей название «прайм-буст», когда проводятся две или больше иммунизации, при которых используются разные типы вакцинирующих препаратов. Например, для первой иммунизации используется ДНК-вакцина, а для второй — рекомбинантный белок, или для первой иммунизации используется ДНК-вакцина, а для второй вирус осповакцины.

Примером успешного начала разработки вакцины в режиме комбинированного подхода является исследование группы Макмайкла из Оксфорда. Был сконструирован ген с множественными CTL эпитопами. Для первой иммунизации использовали ДНК-вакцину, а для второй — рекомбинантный вирус осповакцины штамм-Анкара (MVA). Вакцинация вызвала сильный CTL-ответ у мышей и макак. Иммуногены были оптимизированы так, чтобы сделать их пригодными для применения на человеке, что позволило начать 1-ю фазу клинических испытаний.

В нашей стране также успешно развиваются все эти направления.

В ГНЦ РФ Институте иммунологии МЗ РФ получен набор растворимых рекомбинантных белков ВИЧ: полноразмерного р24 и химерных полипептидов, содержащих фрагменты разных белков ВИЧ. Показано, что конформация рекомбинантного р24 соответствует конформации вирусного прототипа и что он индуцирует образование высоких титров антител. Приготовлен также набор плазмид, составляющих базу для создания ДНК-вакцин. Начата работа по получению белка оболочки с удаленными вариабельными участками. В настоящее время исследуются собственная иммуногенность генно-инженерных белков и приемы, позволяющие управлять ею. На основе генно-инженерного растворимого полипептида, содержащего консервативный участок ВИЧ1, и иммуномодулятора полиоксидония, создан экспериментальный образец вакцины против ВИЧ. Проводятся доклинические испытания. Показана высокая иммуногенность и нейтрализующая активность препарата.

В рамках Межведомственной научно-технической программы «Вакцины нового поколения и медицинские диагностические системы будущего» ведется большая работа в этом направлении. Учеными из Санкт-Петербурга и Новосибирска собран ген, кодирующий полиэпитопный иммуноген (ТС1), индуцирующий CTL-ответ против ВИЧ, получена серия плазмид и ведется разработка ДНК-вакцины, экспрессирующей данный иммуноген.

При применении рекомбинантных субъединичных белков представляется перспективным использовать синтетический полиэлектролитный носитель полиоксидоний, который в течение многих лет используется в качестве иммуностимулятора при лечении иммунодефицитных заболеваний. Примером успешной работы (хотя и не относящейся именно к СПИДу) явилось создание группой ученых под руководством академика Р.В. Петрова вакцины против гриппа («Гриппол») с использованием этого иммуномодулятора. Полученная вакцина по своим показателям превосходит препараты, в которых используются антигены в традиционных аранжировках, и показана для применения даже у больных людей.

Следует еще раз сказать, что создание вакцины против ВИЧ представляет собой задачу огромной трудности. Часть этих сложностей связана с тем, что ВИЧ уникальный вирус, обладающий многообразными биологическими свойствами, позволяющими ему ускользать от действия иммунной системы человека. Одна из проблем, с которой сталкиваются исследователи, это высокая вариабельность ВИЧ и большое многообразие изолятов. Но важно отметить, что при разработке вакцины необходимо учитывать, прежде всего, биологические свойства ВИЧ1, которые варьируют в широком диапазоне. Вирусы отличаются по скорости реп-

ликация, цитопатическому действию, тропизму к разным тканям. Уже давно известно, что вакцины, созданные на основе быстро размножающихся Т-клеточных вирусов, не защищают от заражения так называемыми *первичными*, «дикими» изолятами, преимущественно поражающими моноциты и макрофаги. А недавно было показано, что макаки, иммунизированные химерным вирусом, несущим env ген ВИЧ1 W6.1.D субтипа В, не могут быть защищены от близкого вируса того же В-субтипа-89.бр., который является более вирулентным. Таким образом, биологические свойства конкретного штамма могут оказаться более значимыми, чем принадлежность к тому или иному субтипу.

Помимо вариабельности, разработку вакцины против ВИЧ-инфекции затрудняет отсутствие адекватной модели на животных. В последнее время эта проблема была в какой-то мере преодолена благодаря созданию гибридного вируса SHIV, который может размножаться на макаках, но содержит белки человеческого вируса ВИЧ. 8 марта 2001 г. директор Национального института аллергии и инфекционных заболеваний США (NIAID) А. Фаучи сообщил об успешном создании прототипной вакцины. Была использована комбинированная стратегия прайм-буст (первая иммунизация ДНК-вакциной, вторая рекомбинантным вирусом осповакцины штамм Анкара), такая вакцинация обеспечила защиту макаков от SHIV: в течение 20 недель после заражения вирус не определялся в иммунизированных животных, тогда как у всех контрольных животных развился СПИД и оппортунистические инфекции.

Еще одним интересным примером стратегии разработки вакцин является концепция «fusion-competent vaccine immunogen». Она состоит в том, что эпитопы, способные вызвать образование нейтрализующих антител, обычно скрыты от иммунной системы организма, и активное состояние наступает лишь в момент слияния вируса с клеткой. Исследователю Дж. Нунбергу с соавторами удалось зафиксировать состояние и конформацию участников процесса слияния (белка оболочки ВИЧ gp 120 с клеточным рецептором CD4 и корецептором CCR5) и получить в ответ на него нейтрализующие антитела широкого спектра действия (подавлявшие *in vitro* 23 из 24 первичных изолятов ВИЧ). Справедливости ради заметим, что выделение этого продукта оказалось сложным, и работа группы Нунберга пока не воспроизведена независимыми исследователями. Тем не менее, эти результаты открывают новую перспективу для работы над вакцинами на основе оболочки ВИЧ.

В любом случае, сегодня общепризнанно, что окончательный вывод относительно эффективности той или иной вакцинной стратегии может быть сделан только на основании широких испытаний на человеке. Ясно и то, что вакцина против СПИДа является единственным средством, способным остановить эпидемию. Наступление ученых ведется широким фронтом и по многим направлениям. Развитие современной науки, первые успехи в поиске новых решений и беспрецедентные силы и средства, брошенные на решение этой проблемы, позволяют надеяться, что эффективная вакцина против ВИЧ/СПИДа будет создана.

Список литературы

1. **Онищенко Г.Г.** Научно-техническая программа «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники». Режим доступа : [://http://federalbook.ru/files/FSZ/soderghanie/Tom%206/XIII/Onishenko.pdf](http://federalbook.ru/files/FSZ/soderghanie/Tom%206/XIII/Onishenko.pdf).
2. **Петров Р. В., Хаитов Р. М.** Иммуногены и вакцины нового поколения / ГЭОТАР-Медиа, 2011.
3. **Татьяков С.И., Дейнеко Е.В., Фурман Д.П.** Перспективы создания противотуберкулезных вакцин нового поколения // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011. Том 15.
4. **Производство вакцин: проблемы и решения** (Vaccine manufacturing: challenges and solutions, Jeffrey B.U. Режим доступа: <http://www.cbio.ru/>.
5. **Мешкова Р.Я.** Руководство по иммунопрофилактике для врачей. НИИАХ СГМА, 2007.
6. **Нечаева Е.А., Сенькина Т.Ю., Радаева И.Ф., Вараскин Н.А, Рябичева Т.Г., Свириденко Т.М., Дроздов И.Г.** Разработка живой культуральной гриппозной вакцины /Материалы семинара (Москва, 27–28 ноября, 2008). М.: ФГУ НИИ РИНКЦЭ, НП «Инноватика», 2008.

7. **Куш А.А., Климова Р.Р., Масалова О.В., Федорова Н.Е., Ботиков А.Г., Федякина И.Т., Бурцева Е.И., Исаева Е.И., Дерябин П.Г., Львов Д.К.** Разработка панели моноклональных антител для идентификации и изучения антигенной структуры штаммов вируса гриппа А/Н5N1, выделяемых в Российской Федерации и в других регионах мира / Материалы семинара (Москва, 27–28 ноября, 2008). М.: ФГУ НИИ РИНКЦЭ, НП «Инноватика», 2008.

8. **Денисов Л.А., Иванов Р.А., Морозов Д.В.** Разработка рекомбинантной противогриппозной вакцины с повышенной иммуногенностью / Материалы семинара (Москва, 27–28 ноября, 2008). М.: ФГУ НИИ РИНКЦЭ, НП «Инноватика», 2008.

9. **Раввин Н.В., Куприянов В.В., Гумеров В.М., Котляров Р.Ю., Скрыбин К.Г.** Производство в растениях рекомбинантных белков медицинского назначения с помощью вирусных векторов / Материалы семинара (Москва, 27 – 28 ноября, 2008). М.: ФГУ НИИ РИНКЦЭ; НП «Инноватика», 2008.

10. **Котельникова О.В., Несмеянов В.А., Филатова М.П., Аллилуев А.П., Чибискова О.В., Дрожжина Е.Ю., Короев Д.О., Вольпина О.М.** Конъюгированные вакцины на основе синтетических пептидов – новое направление в создании поливалентной вакцины против менингококковой инфекции / Материалы семинара (Москва, 27–28 ноября, 2008). М.: ФГУ НИИ РИНКЦЭ, НП «Инноватика», 2008.

11. **Жемчугов В.Е.** Конструирование безопасных вакцин – перманентная наднациональная задача / Материалы семинара (Москва, 27–28 ноября, 2008). М.: ФГУ НИИ РИНКЦЭ, НП «Инноватика», 2008.

12. **Шмаров М.М., Тутыхина И.С., Седова Е.С., Зубкова О.В., Веховская Л.В., Неугодова Г.Л., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л., Каверин Н.В., Руднева И.А., Смирнов Ю.А., Новиков Б.В.** Рекомбинантные псевдоаденовирусные наночастицы: конструирование и использование для создания новых иммунобиологических средств защиты населения от особо опасных и социально значимых инфекций / Материалы семинара (Москва, 27–28 ноября, 2008). М.: ФГУ НИИ РИНКЦЭ, НП «Инноватика», 2008.

13. **Свищевская Е.В., Алексеева Л.Г., Некрасов А.Н., Беневоленский С.В.** Мультивалентные рекомбинантные пептидные вакцины / Материалы семинара (Москва, 27–28 ноября, 2008). М.: ФГУ НИИ РИНКЦЭ, НП «Инноватика», 2008.