

УДК 577.112

**ВАКЦИНА комбиВИЧвак, СОДЕРЖАЩАЯ ПОЛИЭПИТОПНЫЕ
В- И Т-КЛЕТОЧНЫЕ ИММУНОГЕНЫ ВИЧ-1**

© 2007 г. Л. И. Карпенко, С. И. Бажан, А. М. Ерошкин,
Л. Р. Лебедев, Р. В. Ужаченко, Н. А. Некрасова, О. А. Плясунова,
П. А. Белавин, С. В. Серегин, Н. К. Данилюк, Е. Д. Даниленко, Б. Н. Зайцев,
В. И. Масычева, А. А. Ильичев, академик РАН **Л. С. Сандахчиев**

Поступило 21.11.2006 г.

Задача создания вакцины против ВИЧ-инфекции имеет чрезвычайно актуальное значение, поскольку это самый надежный способ остановить эпидемию СПИДа, которая распространяется угрожающими темпами. Более 20 лет над решением этой задачи работают многие исследователи разных стран. Трудность создания вакцины против СПИДа связана с высокой вариабельностью вируса, его способностью адаптироваться к давлению иммунной системы и индуцировать иммунопатологию, а также отсутствием моделей инфекции на животных [1].

В основу нашей работы был положен один из наиболее обещающих подходов, связанный с идентификацией Т- и В-клеточных эпитопов в белках вируса и созданием на их основе синтетических полиэпитопных вакцин [2–5]. В данной работе представлены результаты нашей работы по конструированию и доклиническому исследованию комбинированной вакцины комбиВИЧвак, объединяющей два искусственных полиэпитопных иммуногена. Один из них – полиэпитопный белок ТВ1, другой – ДНК-вакцина (плазмида рсDNA-ТС1), кодирующая полиэпитопный иммуноген ТС1.

Белок ТВ1 (T- and B-cell epitopes containing immunogen) был сконструирован в виде полипептида с заранее заданной третичной структурой, в основу которой положен известный пространственный мотив – четырехспиральный пучок. Его аминокислотная последовательность включает четыре Т-клеточных эпитопа (для хелперных и/или цитотоксических Т-лимфоцитов) и пять В-клеточных нейтрализующих эпитопов из белков Env и Gag ВИЧ-1. У мышей и обезьян, иммунизированных рекомбинантным белком ТВ1, регистрируется по-

явление специфических антител, обладающих вируснейтрализующей активностью [6, 7].

Полиэпитопный белок ТС1 (T-cell immunogen) содержит более 80 оптимально отобранных эпитопов (как CD8⁺ CTL, так и CD4⁺ Th). В состав ТС1 были включены эпитопы из основных вирусных белков Env, Gag, Pol и Nef, которые являются высоко консервативными для трех основных субтипов ВИЧ-1 (А, В, С). Ген, кодирующий полиэпитопный иммуноген ТС1, был встроен в векторную плазмиду рсDNA3.1 [8]. Полученная ДНК-вакцина рсDNA-ТС1 индуцировала вирусспецифический Т-клеточный и гуморальный иммунный ответ [9–12].

Вакцина комбиВИЧвак представляет собой искусственные частицы, диаметром от 40 до 100 нм (рис. 1), в центре которых находится ДНК-вакцина рсDNA-ТС1, а на поверхности – гибридный белок ТВ1, конъюгированный с полиглюкином. Таким образом, частицы комбиВИЧвак по своим размерам сравнимы с величиной таких вирусов, как вирусы полиомиелита и полиомы, и прибли-

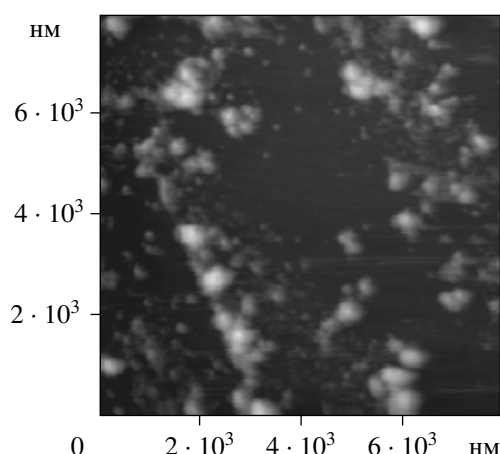


Рис. 1. Изображение вакцины комбиВИЧвак, полученное методом атомно-силовой микроскопии.

Федеральное государственное учреждение науки
Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии "Вектор",
Кольцово Новосибирской обл.

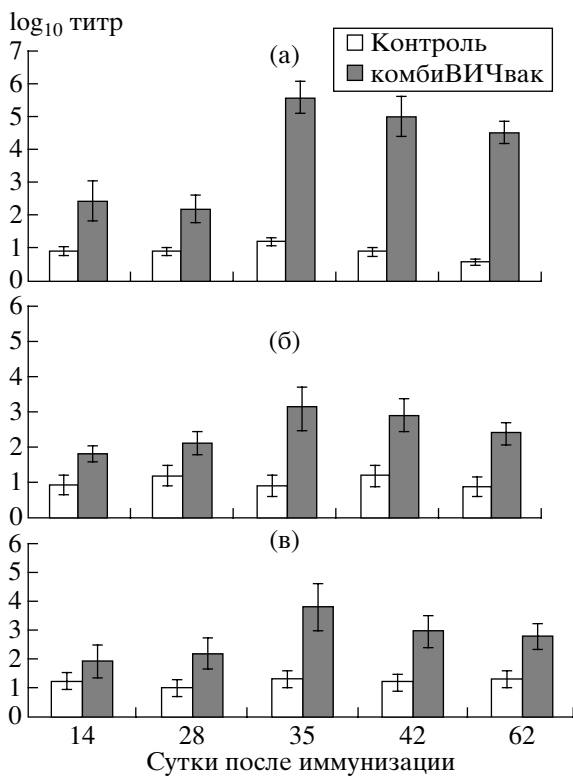


Рис. 2. Титры анти-IgG-антител на 14, 28, 35, 42 и 62-е сутки после иммунизации мышей комбиВИЧвак (опытная группа) и 0.9% NaCl (контрольная группа). При анализе сывороток в качестве антигена были сорбированы ТВІ (а), лизат ВИЧ-1_{EVK} (б) и рекомбинантные белки ВИЧ-1 коммерческой тест-системы “комбиБест анти-ВИЧ-1,2” (Вектор-Бест, Россия) (в). Данные представлены как среднее значение титра ± стандартное отклонение ($n = 5$).

жаются к размерам ВИЧ-1 (рис. 1). Такие размеры позволяют значительно повысить иммуногенность белка ТВІ, который представлен во множестве копий на поверхности частицы. Кроме того, оболочка из полиглюкина защищает ДНК-вакцину от действия нуклеаз и способствует повышению иммуногенности ДНК-вакцины за счет повышения вероятности захвата антигенпрезентирующими клетками.

Результаты нашего исследования показали, что полиэпитопные иммуногены ТВІ и ТСІ в составе вакцины комбиВИЧвак эффективно индуцируют вирусспецифический гуморальный и клеточный ответы (рис. 2, рис. 3). Важно отметить, что, являясь полностью искусственным иммуногеном, белок ТВІ в составе вакцины комбиВИЧвак индуцирует у иммунизированных мышей выработку антител, которые узнают как рекомбинантные, так и природные антигены ВИЧ-1 (рис. 2). Очевидно, что наибольший титр антител был получен при использовании в качестве антигена гомологичного белка ТВІ (рис. 2).

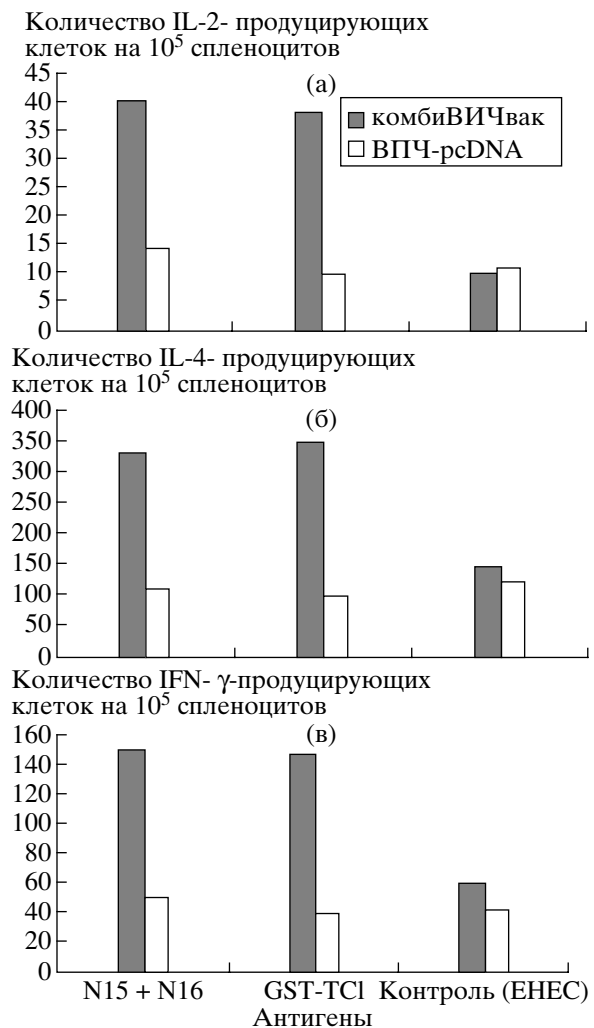


Рис. 3. Исследование цитотоксической активности спленоцитов животных, иммунизированных комбиВИЧвак (опытная группа) и ВПЧ-pcDNA3.1 (контрольная группа). Ответ CTL оценивали по выявлению IL-2- (а), IL-4- (б) и IFN γ -продуцирующих (в) спленоцитов в реакции ELISpot у иммунизированных мышей BALB/c. Селезенки мышей ($n = 5$) из каждой группы были объединены в одну смесь. Для специфической стимуляции продукции цитокинов суспензией спленоцитов использовали рекомбинантный белок *gst-TCl* и смесь двух входящих в него пептидов N15 (DRVIEVVQGAYRAIR – эпитоп из белка gp41) и N16 (KQINMWQEVGKAMYA – эпитоп из белка gp120). В качестве негативного контроля использован полипептид ЕНЕС. Результаты представлены как среднее количество цитокинпродуцирующих клеток на 10^5 спленоцитов.

Одним из основных показателей эффективности вакцины является способность индуцировать антитела, которые могут не только узнавать, но и нейтрализовать вирус. При анализе нейтрализующей активности сывороток рассчитывался индекс нейтрализации (ИН) в соответствии с [13]. Наши результаты показали, что сыворотки мышей, иммунизированных комбиВИЧвак, эффек-

Таблица 1. Оценка вируснейтрализующей активности сывороток

Сыворотка	Индекс нейтрализации*, %	
	разведение сыворотки 1/10	разведение сыворотки 1/50
Объединенная сыворотка иммунизированных комбиВИЧвак мышей	81.90	75.60
ВИЧ-инфицированного человека (СПИД-центр)	99.41	77.83

* Индекс нейтрализации рассчитывали по формуле: $ИН = (ОП_{\text{негатив. сыворотки}} - ОП_{\text{тестируемой сыворотки}}) / (ОП_{\text{негатив. сыворотки}} - ОП_{\text{контрольн. клеток}}) \cdot 100\%$ [13].

тивно подавляли вирусную репликацию в системе *in vitro* на культуре клеток МТ-4, инфицированных вирусом ВИЧ-1_{EVK} (табл. 1). Индекс нейтрализации этих сывороток был сопоставим с ИН сыворотки, полученной от ВИЧ-инфицированного человека. Таким образом, кандидатная вакцина комбиВИЧвак индуцирует высокий гуморальный ответ, причем антитела высокоспецифичны, они не только распознают антигены ВИЧ-1, но и способны нейтрализовать вирус в системе *in vitro*. Все эти данные свидетельствуют о том, что В-клеточные эпитопы в составе частиц комбиВИЧвак доступны для узнавания В-клетками и конформационно близки природным эпитопам ВИЧ-1 белков.

Кроме того, вакцина стимулирует и СТЛ-ответ, что было показано в трех различных тест-системах ELISpot (INF-gamma, IL-2 и IL-4) (рис. 3). Использование для рестимуляции спленоцитов *in vitro* как полноразмерного белка ТС1, так и отдельных эпитопов, входящих в его состав (пептиды N15 и N16), указывает на то, что при ДНК-иммунизации осуществляются все стадии, необходимые для доставки целевого иммуногена иммунной системе, а именно: экспрессия гена ТС1, процессинг целевого белка, представление полученных пептидов (детерминант) CD8⁺ лимфоцитам (СТЛ) совместно с МНС I класса. Так как в состав ТС1 были включены эпитопы, которые являются консервативными среди трех основных субтипов ВИЧ-1 (А, В, С), и включают последовательно из основных вирусных белков Env, Gag, Pol и Nef, это позволяет надеяться, что кандидатная вакцина комбиВИЧвак будет эффективно работать против генетически измененных вариантов ВИЧ-1 путем индукции CD8⁺ СТЛ, специфичных к консервативным Т-клеточным эпитопам.

Исследование токсичности комбиВИЧвак показало, что однократное и многократное внутримышечное введение вакцины комбиВИЧвак мышам в дозе, предполагаемой для введения человеку и 5-кратно ее превышающей, не вызывало существенных или длительно сохраняющихся изменений физиологических, гематологических и биохимических показателей животных. Препарат

при однократном введении не вызывал нарушения микроструктуры внутренних органов, многократные инъекции приводили к усилению преобладающих воспалительных процессов в печени. В месте введения вакцины не зарегистрировано патологических изменений.

В ходе изучения иммунологической безопасности комбиВИЧвак было установлено, что вакцинный препарат не обладал способностью индуцировать аутоиммунную патологию и ослаблять резистентность организма к инфекции, не вызывал развития общей анафилактической реакции. В то же время следует учитывать вероятность кожной сенсибилизации и снижения под действием комбиВИЧвак клеточного иммунного ответа на неродственный антиген.

Таким образом, кандидатная вакцина комбиВИЧвак обладает рядом уникальных свойств. Она объединяет В- и Т-клеточные иммуногены в одной конструкции, один из которых является белком, а другой – ДНК-вакциной. Вакцина индуцирует как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ. Эпитопы, входящие в состав полиэпитопных иммуногенов, являются консервативными среди субтипов А, В, С и представлены разными белками ВИЧ-1. Вакцина комбиВИЧвак может рассматриваться не только как профилактическая, но и как терапевтическая, поскольку индуцирует СТЛ, способные уничтожать инфицированные клетки-мишени. Доклинические испытания вакцины показали, что комбиВИЧвак не вызывает выраженных или длительно сохраняющихся изменений в организме животных. Очевидно, что результаты, полученные в ходе изучения специфической активности и безопасности вакцины, являются серьезным основанием для проведения ее клинических испытаний.

Работа финансировалась по контрактам в рамках МНТП “Вакцины нового поколения и диагностические средства будущего”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Girard M.C., Osmanov S.K., Kieny M.P. // Vaccine. 2006. V. 24. P. 4062–4081.

2. Hanke T., Schneider J., Gilbert S.C. et al. // *Vaccine*. 1998. V. 16. P. 426–435.
3. Goonetilleke N., Moore S., Dally L. et al. // *J. Virol.* 2006. V. 80. № 10. P. 4717–4728.
4. Firat H., Tourdot S., Ureta-Vidal A. et al. // *Europ. J. Immunol.* 2001. V. 10. № 10. P. 3064–3074.
5. Lorin C., Delebecque F., Labrousse V. et al. // *Vaccine*. 2005. V. 23. № 36. P. 4463–4472.
6. Eroshkin A.M., Karginova E.A., Gileva I.P. et al. // *Protein Eng.* 1995. V. 8. P. 167–173.
7. Loktev V.B., Ilyichev A.A., Eroshkin A.M. et al. // *J. Biotechnol.* 1996. V. 44. № 1/3. P. 129–137.
8. Bazhan S.I., Belavin P.A., Seregin S.V. et al. // *Vaccine*. 2004. V. 22. № 13/14. P. 1672–1682.
9. Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Ilyichev A.A. et al. // *Vaccine*. 2004. V. 22. № 13/14. P. 1692–1699.
10. Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Некрасова Н.А. и др. // *Вестн. РАМН*. 2005. № 1. С. 41–44.
11. Бажан С.И., Белавин П.А., Серегин С.В. и др. // *ДАН*. 2004. Т. 395. № 6. С. 825–827.
12. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Игнатъев Г.М. и др. // *Вестн. РАМН*. 2003. № 1 С. 24–30.
13. Карамов Э.В., Павлова Т.В., Корнилаева Г.В. и др. // *Аллергия, астма и клин. иммунология*. 2003. № 9. С. 151–158.