

УДК 615.371.012.1

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ВАКЦИНЫ В ПРОФИЛАКТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА (ОБЗОР)

© 2001 г. А.И. Сливкин

Воронежский государственный университет

Дано теоретическое и экспериментальное обоснование возможности фенотипической коррекции генного контроля иммунного ответа при иммунизации конъюгатами антигена с синтетическими полиэлектролитами. Показана возможность построения искусственных туберкулезных вакцин при использовании антигена из гомогената микобактерий вакцин БЦЖ и синтетических углеводсодержащих полиэлектролитов в качестве адьювантов. Изложены теоретические предпосылки к конструированию вакцин нового поколения с использованием протективных антигенов.

Центральным звеном приобретенной резистентности к туберкулезу является специфический Т-клеточный иммунитет, поскольку с помощью Т-лимфоцитов удается адаптивно усилить резистентность к туберкулезу, а их элиминация резко снижает сопротивляемость к туберкулезной инфекции. В настоящее время известно, что фенотип этих «протективных» Т-лимфоцитов $Lu\ 1^{+}2^{-}$, т.е. они являются Т-хелперами.

Исследования по синтетическим вакцинам развиваются в настоящее время по двум главным направлениям. Первое направление, предложенное М. Sela, состоит в получении детерминантных групп антигенов синтетическим путем с последующим их конъюгированием с синтетическими полиаминокислотами или нативными белками. Однако, очевидно, что такой путь перспективен для создания вакцин против возбудителей, антигены которых заведомо обладают иммуногенными и протективными свойствами. Второе направление состоит в конструировании вакцин на основе синтетических полиэлектролитов и присоединенных к ним гаптенных или детерминантных групп антигенов, полученных синтетически или выделенных из возбудителя. Поскольку полиэлектролиты оказывают иммуностимулирующее действие и отменяют генный контроль иммунного ответа, вакцины на их основе должны обладать всеми достоинствами первого направления и, кроме того, быть эффективными против любого инфекционного заболевания. Перспективным достоинством синтетических вакцин является возможность получения чистых, устойчивых и легко стандартизируемых антигенов за счет химической технологии, которая может оказаться экономичнее и безопаснее микробного и вирусного производства. Кроме того, химический подход открывает перспективу создания поливалентной вакцины в виде еди-

ного полимера, содержащего детерминантные группы антигенов различных возбудителей.

Одним из важнейших путей повышения Т-клеточного иммунитета является использование новых, эффективных, безопасных вакцин. Применяемые в практике вакцины в подавляющем большинстве случаев, кроме антигенных детерминант, включают значительное количество дополнительных примесей, в числе которых могут быть высокотоксичные вещества, вызывающие вредные побочные реакции. В настоящее время достигнут большой прогресс в выделении и очистке антигенов, ответственных за иммунизацию. Следует отметить, что в выделенном таким образом антигене создание иммунитета обеспечивается определенной частью молекулы – антигенной детерминантой. Важнейшей задачей является расшифровка структуры детерминанты, выделение ее или синтез. Подобная молекула или ее фрагмент – идеальная иммунизирующая часть компонента. Установлено, что в составе микобактерий вакцин БЦЖ содержатся антигены: МРВ 70 с ММ 15100 Д, димерный антиген с ММ 46000 Д, антиген-15, метоксимиколат, микозид С. В зависимости от содержания перечисленных антигенов все штаммы БЦЖ подразделяются на 2 группы: более аттенуированные (русский, шведский, Токио, Морто) и более активные (Копенгаген, Пастер, Пекин). По данным Всемирной организации здравоохранения 90% применяющихся в мире вакцин БЦЖ готовятся из трех родительских штаммов (Глакс-1077, Токио-172, Пастер-1173 Р2). Вакцинные препараты различных штаммов являются сложными смесями различных микобактерий БЦЖ [1, 2].

Рассмотрен генетический контроль механизмов протективного действия вакцины БЦЖ. Гены комплекса Н-2 оказывают влияние на восприимчивость к туберкуле-

зу, регулируя иммунный ответ на микобактериальные антигены. Восприимчивость к заражению контролируется аутосомным геном БЦЖ в двух его аллельных формах: резистентной и чувствительной. Эффективность вакцинации находится под контролем генов, входящих в комплекс H-2 и зависит от генотипа организма [3]. Перспективным является создание вакцин для предупреждения экзогенной инфекции (предотвращение диссеминации микобактерий) и для предотвращения реактивации очагов перенесенной болезни. Эти вакцины, содержащие разные антигены и вводимые в организм различными путями, должны действовать на определенные этапы иммунных эффекторных механизмов. Всемирная организация здравоохранения ведет работы по определению возможности использования векторного штамма-носителя для конструирования новой противотуберкулезной вакцины с использованием микобактерий *smegmatis* [4]. Основными этапами конструирования вакцин нового типа являются клонирование генов МБТ, использование моноклональных антител для идентификации рекомбинантных антигенов. Проводится скрининг антигенных фракций микобактерий, подбор носителя, испытание вакцин на экспериментальных моделях, создание вакцин из рекомбинантных штаммов или протективных антигенов. Бактерии штамма-носителя культивируются *in vitro*, не индуцируя специфического противотуберкулезного иммунитета, а клонированные гены стабильно экспрессируются в штамме носителя [5].

Процесс иммунизации осложнен тем, что организм в отношении ряда антигенов во многих случаях не может развить быструю и высокую иммунную реакцию. Механизм генетического контроля силы иммунного реагирования заключается в действии специфических Ig-генов иммунного ответа. В том случае, когда организм (индивидуум) содержит Ig-ген низкого ответа к главным антигенам (например, к антигенам МБТ), то высокий иммунный ответ при использовании классических методов иммунизации практически невозможен. Необходимо преодоление генетически детерминированной низкой реагируемости путем фенотипической коррекции генного контроля иммунитета.

Перспективным является создание искусственных вакцин с включением в них стимулирующего компонента. В состав такой вакцины должны входить соответствующие антигены или антигенные детерминанты и адьювант, определяющий фенотипическую коррекцию. Роль иммунопотенцирующих компонентов для антигенов заключается в превращении их в Т-независимые, что обеспечивает превращение низкоотвечающих организмов в высокоотвечающие [6-10]. Рядом исследований установлено, что наибольшей эффективностью обладают кар-

боцепные и гетероцепные полиионы с определенной структурой. В числе их полиакриловая и полиметакриловая кислоты, поли-4-винилпиридин, поли-2-метил-5-винилпиридин, поли-4-винил-N-этилпиридиний бромид, бетаиновые производные гетероцепных полимерных окисей, а также ряд сополимеров N-винилпирролидона с акриловой кислотой, винилпиридинами. При относительной простоте синтеза и строения этих гидрофильных полимеров, использование в целях иммуностимуляции ограничено ввиду их токсичности. Установлено, что указанные синтетические полиионы стимулируют пролиферацию и миграцию кроветворных стволовых клеток, расселение Т-лимфоцитов из тимуса и В-лимфоцитов из костного мозга в периферические лимфоидные органы. В системе Т- и В-лимфоцитов и эритроцитов барана (ЭБ) синтетические полиэлектролиты повышают выход формирующихся антителопродукторов [11-17]. Следствием воздействия полимера на клетку является значительное повышение проницаемости плазматической мембраны для ионов. По мнению ряда исследователей, способность полииона повышать проницаемость мембраны является главным свойством, определяющим его иммуностимулирующую активность. Предполагается связь повышения ионной проницаемости со способностью полимера вызывать агрегацию белков. Нейтральные полимеры таким свойством не обладают. Методами электронной микроскопии продемонстрирована микроагрегация белков мембраны под действием полиионов с образованием соответствующих кластеров [8, 18, 20].

Определяющим свойством макромолекул является их способность к многоточечному взаимодействию с другими комплементарными молекулами и возникновению устойчивых интерполимерных структур. Характерна также многоточечная адсорбция на химически комплементарных поверхностях. В этом смысле внешние мембраны лимфоцитов являются многоточечным гетерофункциональным сорбентом для полиионов и некоторых водорастворимых полимеров [19-24]. Этим процессом объясняется способность полиэлектролитов непосредственно активировать лимфоциты. Усиление антигенспецифического иммунного ответа при совместном введении полиэлектролита и антигена происходит за счет индуцирования антигеном клональной экспансии специфических лимфоцитов, что увеличивает вероятность встречи антигенспецифических лимфоцитов с полиэлектролитом. Неспецифический полимерный адьювант способствует самосборке высокоспецифичных комплексов антиген-полиэлектролит-лимфоцит. Антиген сосредотачивает действие полииона на соответствующем клоне лимфоцитов; далее полиэлектролит взаимодействует с клеточной мембраной, обеспе-

чивая стимуляцию лимфоидной клетки. Указанная комплексная молекула сочетает в себе антигенную специфичность и иммуностимулирующие свойства даже в присутствии Ig-генов низкого иммунного ответа.

Практическое использование антиген-полиионных иммуногенов в качестве вакцинирующих препаратов может быть реальным при гарантированной адсорбции полиионов на поверхности различных клеток организма с нарушением специфичности антигенного транспорта к клеткам, несущим рецепторы к данному антигену. Значительным препятствием применения этих иммуногенов является высокая токсичность большинства полиионов, затруднения в биодеструкции и выводе из организма [25]. Проводятся исследования с задачей выяснения влияния заряда полииона на способность к адсорбции на клетках со специфическими рецепторами к антигену и в их отсутствии [25, 26].

Предложен для использования антиген-полиионных иммуногенов новый практически нетоксичный, легко разрушаемый в организме и полностью выводимый синтетический полимер «полиоксидоний» (N-оксидированный поли-1,4-этиленпиперазин), примененный для получения противогриппозной вакцины [27].

Проведено исследование нового варианта вакцинирующего препарата. Антиген при этом конъюгировали с каналогеном со свойствами сильного иммуностимулятора (циклический декапептид грамицидин S). В качестве спейсера использованы нейтральные полимеры декстран или полиэтиленоксид. Учитывая особенность механизма действия мембраноактивного полиэлектролита, в качестве иммуностимулятора могут быть использованы другие мембраноактивные соединения (например, грамицидин S). Эффективность новых иммуногенов определяется также структурными свойствами длинноцепного спейсера. Большая степень свободы обеспечивает возможность одновременного функционирования на мембране клетки двух объединенных центров реагирования; антиген фиксируется со своим рецептором на клетке, в то же время каналоген локализуется на липидном бислое мембраны [8, 18, 28]. Для рассмотренных вариантов конъюгированных полимер-субъединичных вакцин с участием мембраноактивного полиэлектролита или нейтрального полимерного спейсера, несущего 1-2 группы грамицидина S, характерен высокий иммунный ответ. При повторном введении этих синтетических вакцин развивается вторичный иммунный ответ, в десятки раз более интенсивный, чем первичный, и значительно более продолжительный [27, 28].

Проведено исследование с целью получения синтетических иммунизирующих вакцин-конъюгатов набора антигенов МБТ с полиэлектролитом. Антигены выде-

лены из клеточных оболочек МБ БЦЖ, а также использован щелочной белок из гомогената клеток БЦЖ, не оказывающий защитного действия без адьюванта. Для приготовления антиген-полиэлектролитных комплексов использовали полиакриловую кислоту с ММ 80 тыс. Конъюгаты получали смешиванием растворов антигенов и полимера с нефелометрическим контролем процесса. Защитный эффект синтетических вакцин был получен на модели туберкулезной инфекции животных при использовании протектогена с ММ 60 тыс., выделенного из клеточных оболочек БЦЖ, конъюгированного с полиакриловой кислотой. Более выраженное защитное действие характерно для щелочного белка, также конъюгированного с полиакриловой кислотой. По данным исследования установлено наличие в составе клеточных оболочек БЦЖ отдельной группы антигенов с ММ 40000-60000, ответственной за индукцию протективного иммунного ответа. Установлено также наличие двух групп антигенов, определяющих как усиление туберкулезного процесса (с ММ 150000), так и не участвующих в защите от инфекции (с ММ 10000-30000). Протективный эффект заключался в активной стимуляции как клеточного, так и гуморального иммунного ответа. Оптимальная доза конъюгата – 150-250 мкг при однократном подкожном введении (мыши линии СВА) [29].

Синтез искусственных комплексов антигенов МБТ осуществлен с применением в качестве адьювантов винильных полимеров с углеводными боковыми цепями. Создание антигенполиионного комплекса осуществлялось с использованием щелочного белка (Б) из гомогената клеток БЦЖ. В качестве полимерных носителей использовали поли-3-метакрилоилсиларовую кислоту (ПМК) с M_{cp} 30-35 тыс и поли-6-метакрилоил-2,4,3,5-лиметиленглюконовую кислоту (ПДГ) с M_{cp} 40-50 тыс [30]. Полимерные комплексы со щелочным белком БЦЖ получали смешиванием водных растворов компонентов при контроле спектрофотометрическим и нефелометрическим методами. Иммуномодулирующие свойства антиген-полиионных конъюгатов определяли по их действию на продукцию антителообразующих клеток (АОК) β -лимфоцитов к эритроцитам барана (ЭБ) методом локального гемолиза в геле. Результаты оценивали по среднему количеству АОК на 10^6 ядерных клеток селезенки и выражали коэффициентом иммунного ответа (КИО). Контрольные опыты проводили с левамизолом. Наибольшее иммуностимулирующее действие характерно для конъюгатов Б-ПДГ в дозе 50 мг/кг. Антиген-полиионный комплекс Б-ПМК проявляет приблизительно аналогичную иммуноотропность. Для исследования протективного эффекта от туберкулезной инфекции животных иммунизировали антиген-полиионным комплексом Б-ПМК живой культурой БЦЖ,

комплексом Б-ПДГ (контроль – физиологический раствор). Защитное действие оценивали по средней продолжительности жизни животных. Клеточный иммунный ответ устанавливался по реакции гиперчувствительности замедленного типа на туберкулин. Установлено, что антиген-полиэлектrolитные комплексы Б-ПМК и Б-ПДГ проявляют статистически достоверную протекторную защиту против туберкулезной инфекции. Наиболее сильное защитное действие оказывает антиген-полиионный комплекс Б-ПМК [31].

Иммуноактивные комплексы получали при смешивании водных растворов антигенов с полиэлектролитами, карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ), а также карбоксиметилкрахмалом (КМК). При изучении защитного эффекта установлено, что во всех случаях конъюгаты с КМЦ и КМК вызывали выраженное защитное действие от инфекции (H37Rv). Отмечен высокий уровень антител через две недели после иммунизации [32].

Проведено исследование механизмов связывания белкового антигена с полиметакрилатами сахарных кислот [33].

Представлены перспективы развития новых вакцин против туберкулеза и краткий обзор существующего в настоящее время положения в этой области. Основные типы противотуберкулезных вакцин, исследованные в последнее время – вакцины на основе бактериальной ДНК, культуральных фильтратов МБТ. Изучались новые рекомбинантные, аукотропные микобактериальные вакцины, а также вакцины из авирулентных микобактерий [34]. Возможности вакцинации с помощью ДНК продолжают изучаться в направлениях: эффективность hsp 65 ДНК; поиск дополнительных антигенов; защитный эффект от кандидата на производство вакцины; ответные реакции на Th1 и Th2; характеристика защитных спленоцитов. Найдено, что при ДНК-вакцинации генерируется максимальное количество защитных спленоцитов. Определено также, что при вакцинации ДНК генерируется максимальное количество защитных Т-клеток [35, 36]. Ведутся также поисковые исследования секретируемых МБТ белков с точки зрения использования их для получения вакцин. Возможности создания рекомбинантных БЦЖ, экспрессирующих цитокины, которые усиливают иммунный ответ, достаточно перспективны в расчете на производство вакцин. Проводится также исследование генетических различий БЦЖ и вирулентных микобактерий *bovis* [37].

Проведено исследование иммунологических свойств специфических иммуномодуляторов адьювантного типа при экспериментальном туберкулезе (мыши линии СВА). Применявшиеся иммуномодуляторы содержат туберкулезные антигены и синтетический полиэлектролит полиоксидоний.

Создана библиотека оптимизированной ДНК МБТ в космидах. Клонирование космид в бактериальный вектор, используемый для иммунизации экспериментальных животных, позволяет отобрать гены МБТ, которые кодируют протективные белки, с применением их в новых вакцинах. Бактериальный вектор, культивируемый в условиях *in vitro*, не индуцирующий специфического противотуберкулезного иммунитета в данной экспериментальной системе, обеспечивающий экспрессирование генов МБТ из космид, определен в виде возможного варианта как микобактерии *smegmatis* [38, 39]. Полученные при исследовании данные свидетельствуют, что подкожная вакцинация (мыши В6) большой дозой МБ *smegmatis* приводит к персистенции этой бактерии в лимфатических узлах хозяина. Наличие данных бактерий в течение 10 суток после вакцинации достаточно для запуска иммунного ответа в дренирующих узлах. Положительный вторичный ответ лимфоцитов, вакцинированных МБ *smegmatis*, мышей слабо выражен и резко уменьшается к семнадцатому дню. Данный вид вакцинации не стимулирует усиление реакции гиперчувствительности замедленного типа на микобактериальные антигены. Тип ответа более связан с развитием протекции от летального заражения штаммом H37Rv. В тоже время вакцинация слабым (пражским) штаммом БЦЖ достаточна для индукции развития гиперчувствительности замедленного типа и протекции к последующему заражению вирулентным штаммом МБТ. Индуцируемый микобактериями *smegmatis* слабый иммунный ответ не препятствует использованию генов МБТ, экспрессируемых в данном векторе для изучения ожидаемого протективного эффекта. Несмотря на быстрый клиренс микобактерий *smegmatis* из организма хозяина, персистенция в течение двух недель, по мнению авторов, достаточно для ваццинной эффективности, трансфицированной генами МБТ клонов микобактерий *smegmatis* [39].

В связи с имеющимися поствакцинальными осложнениями, особенно у детей в возрасте до трех лет, актуальным является установление корреляции между иммунологической эффективностью вакцины и состоянием прививаемых коллективов, их иммунологической реактивностью, обусловленной различными факторами (географический, социальный, генетический и др.) для объективного прогнозирования роли вакцинации в борьбе с туберкулезом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Краткие сообщения о деятельности ВОЗ // Бюллетень ВОЗ. 1990. Т. 68. № 1. С. 87-95.
2. Groves M.J. BCG: прошлое, настоящее и будущее туберкулезной вакцины // J. Pharm. and Pharmacol. 1997. Vol. 49. Suppl. 1. С. 7-15.

3. Хоменко А.Г., Авербах А.А., Литвинов В.И., Мороз А.М. Проблемы наследственности при болезнях легких. М. 1990. 239 с.
4. Гизатудина Н.М. // Туберкулез. 1998. № 9. С. 1-5.
5. Еремеев В.В., Майоров К.Б., Авдиенко В.Г. и др. // Проблемы туберкулеза. 1996. № 1. С. 49-51.
6. Инсанов А.Б. Химиотерапия больных хроническим деструктивным туберкулезом легких с применением иммуностимуляторов: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М. 1984.
7. Петров Р.В., Хаитов Р.М. // Успехи совр. биологии. 1979. Т. 88. вып. 36. С. 307 - 321.
8. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.И. Иммуногенетика и искусственные антигены. М. 1983. 255 с.
9. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Искусственные антигены и вакцины. М. 1988. 287 с.
10. Дмитриев Б.А. // Иммунология. 1986. № 1. С. 24-29.
11. Нажмитдинов А.М., Дишкант И.П., Хаитов Р.М. // Иммунология. 1980. № 2. С. 50-52.
12. Норимов А.Ш., Некрасов А.В., Сивук Н.Е. и др. // Иммунология. 1983. № 4. С. 43-45.
13. Норимов А.Ш., Некрасов А.В., Сивук Н.Е. и др. // Иммунология. 1983. № 6. С. 24-27.
14. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Манько В.М., Михайлова А.А. Контроль и регуляция иммунного ответа. Л. 1981. 311 с.
15. Сивук Н.Е., Хаитов Р.М., Норимов А.Ш. и др. // Иммунология. 1985. № 6. С. 57-59.
16. Хаитов Р.М., Норимов А.Ш., Завгородний С.Г. // Иммунология. 1980. № 2. С. 47-49.
17. Хаитов Р.М., Маджидов А.В., Некрасов А.В. // Иммунология. 1984. № 2. С. 18-21.
18. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.И. // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. № 6. С. 599-604.
19. Кабанов В.А., Топчиев Д.А. Полимеризация ионизирующихся мономеров. М. 1975. 224 с.
20. Кабанов В.А., Евдаков В.П., Мустафаев М.И. и др. // Молекул. биол. 1977. Т. 11. вып. 3. С. 582-597.
21. Кабанов В.А., Мустафаев М.И., Норимов А.Ш. и др. // ДАН СССР. 1978. Т. 243. № 5. С. 1330-1333.
22. Кабанов В.А., Мустафаев М.И., Гончаров В.В. // Высокомолек. соед. 1981. Т. 23. № 2. С. 261-270.
23. Кабанов В.А., Петров Р.В., Хаитов Р.М. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева. 1982. Т. 27. № 4. С. 57-68.
24. Кабанов В.А., Мустафаев М.И., Некрасов А.В. и др. // ДАН СССР. 1984. Т. 274. № 4. С. 998-1001.
25. Petrov R.V., Khaitov R.M., Babakin A.A. // Allergy Clin. Immunol. News. 1992. V. 4. № 3. P. 87-91.
26. Petrov R.V., Khaitov R.M. // Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol. 1986. V. 10. № 3. P. 105-110.
27. Пат. 1580617 СССР, А61К 39/145. Способ получения вакцины против вируса гриппа / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов, А.В. Некрасов и др.; Бюл. 1997. № 4.
28. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Искусственные вакцины. М. 1986. 80 с.
29. Романова Р.Ю., Авербах М.М., Мороз А.М., Норимов А.Ш. // Проблемы туберкулеза. 1988. № 5. С. 49-54.
30. Сливкин А.И. Непредельные эфиры оксикислот на основе моносахаров и их полимеризация. Деп. в ВИНТИ. № 3260-75 от 17.11.75. ВГУ.
31. Сливкин А.И., Лапенко В.Л., Хайкин Б.Я. и др. // Прикладные информационные аспекты медицины: (Сб. науч. тр.). Воронеж. 1999. Т. 2. № 2. С. 43-46.
32. Сливкин А.И., Лапенко В.Л., Соколова Г.Б. и др. Искусственные комплексы антигенов туберкулезных микобактерий с полиионами // Тез. докл. 6-й нац. конгр. "Человек и лекарство". 1999. С. 470-471.
33. Сливкин А.И., Селеменов В.Ф., Лапенко В.Л. и др. // Изв. ВУЗов РФ. Химия и химическая технология. 2000. Т. 43. Вып. 2. С. 150-155.
34. Progress in the development of new vaccines against tuberculosis // Orme Jan M. Int. J. Tuberc. and Lung Disease. 1997. V. 1. № 2. P. 95-100.
35. Lowrie Douglas B., Silva Celio L., Tascon Ricardo E. // Immunol. and Cell. Biol. 1997. V. 75. № 6. С. 591-594.
36. Strugnell R.A., Drew D., Mercieca J. et al. // Immunol. and Cell. Biol. 1997. V. 75. № 4. P. 364-369.
37. Adam Mc. // J. Infect. Dis. 1997. V. 1. № 3. P. 172-178.
38. Романова Р.Ю., Мороз А.М., Горшова Л.А. и др. // Тез. докл. II Рос. нац. конгр. "Человек и лекарство". М. 1995. С. 250.
39. Garbe T., Harns D., Vordemeier M. et al. // Infect. Immun. 1993. V. 61. P. 260-267.