

И.В.Тучков, А.К.Никифоров

## ДНК-ИММУНИЗАЦИЯ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В обзоре приводятся литературные данные, посвященные разработке ДНК-вакцин против вируса бешенства. Представлены результаты исследований, касающиеся генной вакцинации различных моделей лабораторных животных и разных путей введения вакцины. Рассматривается возможность потенцирования иммуногенности ДНК-вакцин при использовании адъювантов и цитокинов. Обсуждаются пути совершенствования полинуклеотидных вакцин.

*Ключевые слова:* бешенство, ДНК-вакцины, полинуклеотидные вакцины.

Объем накопленных знаний об иммунологии возбудителей опасных инфекций во многом определяет изменение в стратегии конструирования вакцинных препаратов, отвечающих современным требованиям ВОЗ.

На данном этапе развития биотехнологии и микробиологии традиционные вакцины – живые, химические и комбинированные уже не в полной мере удовлетворяют ряду требований, предъявляемых к современным иммунобиологическим препаратам: простота введения, отсутствие негативных побочных эффектов, низкая себестоимость конечного продукта.

Полинуклеотидная или ДНК-иммунизация открывает широкие перспективы в производстве безопасных и эффективных вакцин нового поколения. Этот принципиально новый подход к созданию вакцин основан на способности нуклеиновых кислот существовать несколько недель и даже месяцев в цитоплазме клеток организма-хозяина, не встраиваясь в его геном, но поддерживая синтез закодированных в них белков. Такая вакцинация может быть предпочтительной для страдающих аллергией детей и людей преклонного возраста. ДНК-вакцины представляют собой векторные молекулы, которые содержат в себе ген (гены), кодирующие белки опасных вирусов или других патогенов. При введении ДНК-вакцины в клетки человека происходит синтез чужеродного белка и достаточно эффективная активация иммунной системы.

В работе J.Wolff и соавт. [36], которая и предопределила в дальнейшем стремительное развитие нового направления в вакцинопрофилактике, было показано, что введение очищенной ДНК в организм животного может *in vivo* приводить к экспрессии закодированных в генах белков. Следует отметить, что собственно ДНК-вакцинация, вызывающая полноценный иммунный ответ с определением специфических антител (гуморальный ответ), была проведена в 1992 г. D.C.Tang и соавт. [32], а цитотоксических Т-лимфоцитов (клеточный ответ) – J.B.Ulmer и соавт. в 1993 г. [33].

Преимущества ДНК-иммунизации перед распространенными способами иммунопрофилактики массовых инфекционных болезней животных заклю-

чаются в том, что ДНК-вакцины без персистирования в макроорганизме приближают искусственно вызываемый иммунный ответ к возможному при инфицировании природными возбудителями; иммунная реакция на введение генов антигенов сбалансирована и состоит из системного и местного ответов. Каждый из них включает иммуноглобулиновый и клеточный ответы. Иммунный ответ такого типа важен для противодействия инфекциям, вызываемым бактериями и вирусами [2].

Помимо иммуногенности, ДНК-вакцины обладают рядом других практических преимуществ. Будучи изначально свободными от чужеродных белков, они не вызывают различные побочные реакции, которые наблюдаются у обычных вакцин. Помимо безопасности, они отличаются дешевизной, отсутствием длительных процедур по очистке от субъединичных белков, стабильны, могут храниться и транспортироваться при комнатной температуре.

Кроме того, клинические испытания на людях подтвердили их безопасность и эффективность, что стимулировало исследования в данном направлении [5, 6, 22, 24, 34].

К настоящему времени иммунный ответ на ДНК-вакцины был получен у 14 семейств животных – от мышей и рыб до дельфинов и обезьян. Иммунный ответ был получен на более чем 40 вирусных, бактериальных, грибковых и паразитарных возбудителей, причем в большом проценте случаев это сопровождалось созданием невосприимчивости к соответствующему микроорганизму. С ДНК-вакцинацией, развивающейся огромными темпами, связывают надежды на профилактику и лечение многих заболеваний, в том числе и особо опасных инфекций.

Одной из социально значимых особо опасных инфекций является бешенство. Бешенство, прогрессирующий энцефалит с летальным исходом [29], вызывается вирусом бешенства из рода *Lyssavirus*. Большинство случаев бешенства, зарегистрированных в развивающихся странах, связаны с дикими животными (енот, скунс, летучая мышь, лиса) [37]. Покусы бешеными собаками являются причиной свыше 99 % смертельных случаев по всему миру [31]. Особенно серьезно эта проблема стоит в Индии, где ежегодно

30000 человек умирают, а свыше 2 млн нуждаются в постэкспозиционной вакцинации. Бездомные собаки, обитающие в населенных пунктах, – причина большинства случаев бешенства у человека. Хотя имеются мощные и безопасные вакцины на основе культур клеток, однако их эффективность может быть снижена за счет нарушений холодовой цепи при хранении, плохом общем состоянии здоровья индивидуума, плохих методиках вакцинации.

Во многих субъектах Российской Федерации сохраняется напряженная обстановка по бешенству диких и домашних животных. По данным доклада Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, ежегодно в стране регистрируется более 400 тыс. случаев укусов, ослюнения и оцарапывания животными. Учитывая, что бешенство является абсолютно летальным инфекционным заболеванием и требует проведения напряженного курса лечебно-профилактических прививок по жизненным показаниям, каждый год в стране антирабическую помощь получают от 200 до 400 тыс. чел. и более [1].

Для профилактики бешенства имеется множество вакцин на основе культур клеток [29]. Однако их применение ограничено высокой стоимостью и риском развития анафилактических, нервнопаралитических или энцефалитных побочных реакций. Это указывает на необходимость создания более надежных кандидатов в вакцины, которые должны создавать выраженный иммунный ответ для защиты от инфекции. Кандидат в иммуногены должен индуцировать выраженный иммунитет Th2, то есть гуморальный иммунный ответ играет доминирующую роль в индукции протективного иммунитета против вируса бешенства [7, 13, 30]. Гликопротеин вируса бешенства является основным антигеном, ответственным за индукцию образования вируснейтрализующих антител и создание иммунитета против летальной инфекции.

В 1994 г. Z.Q.Xiang и соавт. опубликовали работу, в которой впервые показана возможность антирабической ДНК-вакцинации и продемонстрирована полная защита животных от последующего заражения вирусом бешенства [39].

ДНК-вакцины от бешенства успешно применяются у мышей [15, 40], собак [27]. Различия в иммунном ответе у собак и кошек изучали J.E.Osorio и соавт. [26]. У собак внутримышечный путь введения вызывал более сильный и продолжительный иммунный ответ, у кошек более низкий (использовалась та же доза). Однако эффективность была повышена увеличением дозы до 300 мг плазмиды. Интересно, что у кошек внутрикожный путь введения вызывал лучший ответ, чем внутримышечный. К тому же последующая внутрикожная вакцинация у кошек вызывала более чем 4-кратный рост среднего геометрического показателя титра вируснейтрализующих антител [26]. Представляют интерес данные о том, что индукция иммунного ответа была получена на полинуклеотидные препараты при вакцинации нече-

ловекообразных обезьян [19].

L.Fischer и соавт. использовали лошадь как модель при генной вакцинации для изучения иммунного ответа у крупных млекопитающих. Изучались две разные стратегии усиления иммунного ответа. Использование фосфата алюминия для введения ДНК-вакцины хоть и ускоряет начало и интенсивность выработки антител, но недостаточно для достижения сероконверсии у всех вакцинированных животных. Однако, когда ДНК-вакцина была связана с катионным липидом DMRIE-DOPE вместо фосфата алюминия, наблюдался сильный по интенсивности и быстрый иммунный ответ. Этот тип вакцинации дал 100 % сероконверсию после первичного курса из 2 инъекций. Данное исследование показывает, что ДНК-вакцинация лошадей возможна, и дальнейшие разработки в этой области позволят достигнуть иммунного ответа, сопоставимого с традиционными вакцинами [11].

Представляют интерес данные о том, что способ и место введения ДНК-вакцины влияют на иммунный ответ, причем как в качественном, так и в количественном отношении. Успешная ДНК-иммунизация была достигнута при подкожной [9], внутрикожной [12], внутримышечной [28] и интраназальной [25] вакцинации.

Кроме общепринятого введения вакцинного препарата с помощью шприца (для мелких лабораторных животных обычно гамильтоновского), возможно введение плазмид с помощью безыгольных инъекторов [21]. В последнее время показано, что иммуногенность вакцины можно повысить при инъекции в эпидермис с помощью специального инъектора, используя в качестве носителя микрочастицы золота (метод *gene-gun*). Данный способ позволяет более просто и быстро вводить ДНК в организм животного, по сравнению с обычными игольчатыми инъекторами, и, что более важно, сила импульса такова, что частицы, несущие ДНК, способны преодолевать плазматические мембраны клеток. Таким образом, все клетки, лежащие на пути пучка частиц, трансфицируются, что способствует доставке ДНК внутрь клетки [18]. К тому же при введении одинаковых количеств ДНК использование генной пушки дает более сильный иммунный ответ чем при внутримышечном введении [17].

На наш взгляд, к настоящему времени мнение о ДНК-вакцинах из разряда «в этом что – то есть» перешло в разряд «кто же этого не знает». Поэтому усилия исследователей направлены на создание различных стратегий по повышению иммуногенности и защиты, а не на создание новых вакцин. Эти стратегии основаны на использовании адъювантов [20, 23], бустерной вакцинации [38] и цитокинов [10]. Комбинированное применение ДНК-вакцины и клеточно-культуральной инактивированной вакцины дает более сильный иммунный ответ чем при использовании только ДНК-вакцины. Количество клеточно-культуральной инактивированной вакцины, которое необходимо добавить к ДНК-вакцине, в 625 раз меньше чем стандартная доза

культурально-клеточной вакцины. Комбинированная вакцина индуцирует у крупного рогатого скота сильный иммунный ответ [3]. Учеными из института аллергии и инфекционных болезней (США) установлено, что бустерная иммунизация ДНК-вакциной или инактивированной вакцинами вызывала быстрый и сильный иммунный ответ в независимости от типа вакцины, которой проводилась первичная вакцинация. В то же время бустерная вакцинация рекомбинантной вакциной не вызывала роста титра антител при условии, что первичная вакцинация проводилась тоже рекомбинантной вакциной, но, если первичная иммунизация проводилась ДНК-вакциной или инактивированной вакцинами, отмечалось слабое нарастание титра антител [16].

Еще одним важным преимуществом ДНК-вакцины является возможность встраивания в ДНК плазмиды гликопротеинов нескольких лиссавирусов, что позволяет повысить степень защиты против нескольких серотипов вируса бешенства [14].

Известно, что образование защитного иммунитета при вакцинации новорожденных затрудняется их слабым иммунным ответом, а также наличием материнских антител. Исследования ДНК-вакцин показали, что они способны индуцировать хороший иммунитет у новорожденных животных и преодолевать отрицательное действие присутствующих в организме новорожденных материнских антител. Так, в опытах на мышах возрастом 24 ч, иммунизированных плазмидной ДНК, кодирующей гликопротеин G, наблюдался Т-хелперный иммунный ответ. Иммунный ответ не отличался от такового у взрослых [35].

Научные и прикладные исследования, посвященные разработке ДНК-вакцин, сопровождаются производственным процессом, который может быть легко масштабирован для приготовления количеств продукта в нужных объемах. В связи с этим большой интерес представляют данные М.М.Диого и соавт. [8], касающиеся крупномасштабного выделения плазмидной ДНК. Экспериментальная ДНК-вакцина, кодирующая гликопротеин G, была получена из *E. coli*. Плазида выделена путем щелочного гидролиза, предварительно очищена и концентрирована с помощью изопропаноловой преципитации и окончательно очищена с помощью гидрофобной хроматографии и диализа. Качество продукта контролировалось с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, Саузерн-блоттинга, электрофореза в агарозном геле, ЛАЛ-теста и исследований белка. Экспрессия гликопротеина G вируса бешенства исследовалась на нейробластомных клетках *in vitro*. Продукция вируснейтрализующих антител и защита против внутримозгового заражения исследовалась на мышах. В результате из 4,5 л среды было получено 142 мг плазмиды (99 % степени очистки в HPLC) [8].

Обсуждая пути совершенствования ДНК-вакцинации, следует отдельно остановиться на методе электропорации *in vivo*, применение которого после инъекции ДНК-вакцины существенно увели-

чивает процент трансдуцированных клеток, что в свою очередь ведет к повышению уровня экспрессии антигенов до 1000 раз, по сравнению с обычным введением препарат, и увеличению иммуногенности [4]. По словам доктора Джоржа Павлакиса, руководителя отдела ретровирусов Национального института рака (США), электропорация является золотым стандартом для введения ДНК-вакцин, давая нам лучший результат иммуногенности.

Подводя итог вышесказанному, необходимо отметить, что не следует принимать ДНК-вакцины как панацею от всех заболеваний, особенно если это касается человека, но если в ближайшее время появятся ДНК-препараты против зоонозов и зооантропонозов или при бустерной иммунизации получится снизить дозу исходной вакцины в сотни раз, экономический эффект от применения генетических вакцин будет грандиозным.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2008 году: Государственный доклад. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2009. 467 с.
2. Снопницкий М.В. ДНК-иммунизация в профилактике инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. Ветеринария. 1998; 5:18–24.
3. Biswas S., Reddy G. S., Srinivasan V.A., Rangarajan P.N. Pre-exposure efficacy of a novel combination DNA and inactivated rabies virus vaccine. Hum. Gene Ther. 2001; 12:1917–22.
4. Bodles-Brakhop A.M., Heller R., Draghia-Akli R. Electroporation for the Delivery of DNA-based Vaccines and Immunotherapeutics. Current Clinical Developments. Mol. Ther. 2009; 17(4):585–92.
5. Calarota S., Bratt G., Nordlund S., Hinkula J., Leandersson A.C., Sandstrom E. et al. Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. Lancet. 1998; 351(9112):1320–5.
6. Ceberea I., Dorrella L., McShane H., Simmons A., McCormack S., Schmid C. et al. Phase I clinical trial safety of DNA- and modified virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccines administered alone and in a prime-boost regime to healthy HIV-1-uninfected volunteers. Vaccine. 2006; 24(4):417–25.
7. Cox J.H., Dietzschold B., Schneider L.G. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. Infect Immun. 1977; 16(3):754–9.
8. Diogo M.M., Ribeiro S.C., Queiroz J.A. et al. Production, purification and analysis of an experimental DNA vaccine against rabies. J. Gene Med. 2001; 3:577–84.
9. Ertl H., Verma P., Xiang Z. Plasmid vectors as anti-viral vaccines. DNA vaccines: A new era in vaccinology. Ann. NY Acad. Sci. 1995; 772:77–87.
10. Ertl H., Xiang Z. DNA vaccines to rabies virus: Effects of cytokines on the immune response. In: Vaccine 96: Molecular Approaches to the Control of Infectious Diseases. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1996. 83–6.
11. Fischer L., Minke J., Dufay N., Baudu P., Audonnet J.C. Rabies DNA vaccine in the horse: strategies to improve serological responses. Vaccine. 2003; 21(31):4593–6.
12. Fodor I., Kucsera L., Fodor N., Palfi V., Grabko V.I. Gene immunization of mice with plasmid DNA expressing rabies virus glycoprotein. Acta Vet. Hung. 2000; 48(2):229–36.
13. Hua R.L., Liua Y., Zhang S.F., Zhang F., Fooks A.R. Experimental immunization of cats with a recombinant rabies-canine adenovirus vaccine elicits a long-lasting neutralizing antibody response against rabies. Vaccine. 2007; 25(29):53017.
14. Jallet C., Jacob Y., Bahloul C., Drings A., Desmezieres E., Tordo N., Perrin P. Chimeric lyssavirus glycoproteins with increased immunological potential. J. Virol. 1999; 73(1):225–33.
15. Lodmell D.L., Ewalt L.C. Post-exposure DNA vaccination protects mice against rabies virus. Vaccine 2001; 19:2468–73.
16. Lodmell D.L., Ewalt L.C. Rabies vaccination: comparison of neutralizing antibody responses after priming and boosting with different combinations of DNA, inactivated virus, or recombinant vaccinia virus vaccines. Vaccine. 2000; 18(22):2394–8.
17. Lodmell D.L., Parnell M.J., Bailey J.R., Ewalt L.C., Hanlon C.A. One-time gene gun or intramuscular rabies DNA vaccination of



non-human primates: comparison of neutralizing antibody responses and protection against rabies virus 1 year after vaccination. *Vaccine*. 2001; 20(5-6):838-44.

18. Lodmell D.L., Ray N.B., Ewalt L.C. Gene gun particle-mediated vaccination with plasmid DNA confers protective immunity against rabies virus infection. *Vaccine*. 1998; 16:115-8.

19. Lodmell D.L., Ray N.B., Parnell M.J., Ewalt L.C., Hanlon C.A., Shaddock J.H. et al. DNA immunization protects non-human primates against rabies virus. *Nat. Med.* 1998; 4:949-79.

20. Lodmell D.L., Ray N.B., Ulrich T., Ewalt L.C. DNA vaccination of mice against rabies virus: effects of the route of administration and the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPL). *Vaccine*. 2000; 18 (11):1059-66.

21. Lunn D.P., Soboll G., Schram B.R. et al. Antibody responses to DNA vaccination of horses using the influenza virus hemagglutinin gene. *Vaccine*. 1999; 17:2245-58.

22. MacGregor R.R., Boyer J.D., Ugen K.E., Lacy K.E., Gluckman S.J., Bagarazzi M.L. et al. First human trial of a DNA based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host responses. *J. Infect. Dis.* 1998; 178(1):92-100.

23. Margalith M., Vilalta A. Sustained protective rabies neutralizing antibody titers after administration of cationic lipid-formulated pDNA vaccine. *Genet. Vaccines Ther.* 2006; 4(2):1-6.

24. Mulligan M.J., Russell N.D., Celum C., Kahn J., Noonan E., Montefiori D.C. et al. Excellent safety and tolerability of the human immunodeficiency virus type 1 pGA2/JS2 plasmid DNA priming vector vaccine in HIV type 1 uninfected adults. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2006; 22(7):678-83.

25. Oh Y.K., Kim J.P., Hwang T.S., Ko J.J., Kim J.M., Yang J.S., Kim C.K. Nasal absorption and biodistribution of plasmid DNA: an alternative route of DNA vaccine delivery. *Vaccine*. 2001; 19:4519-25.

26. Osorio J.E., Tomlinson C.C., Frank R.S. et al. Immunization of dogs and cats with a DNA vaccine against rabies virus. *Vaccine*. 1999; 17:1109-16.

27. Perrin P., Jacob Y., Aguilar-Setien A. et al. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine*. 1999; 18:479-86.

28. Ray N.B., Ewalt L.C., Lodmell D.L. Nanogram quantities of plasmid DNA encoding the rabies virus glycoprotein protect mice against lethal rabies virus infection. *Vaccine*. 1997; 15:892-5.

29. Rupprecht C., Hanlon C.A., Hemachuda T. Rabies re-examined. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2(6):327-43.

30. Rupprecht C., Wiktor T.J., Johnston D.H., Hamir A.N., Dietzschold B., Wunner W.H. et al. Oral immunization and protection of raccoons (*Procyon lotor*) with a vaccinia-rabies glycoprotein recombinant virus vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; 83(20):7947-50.

31. Smith J.S., Seidel H.D. Rabies: a new look at an old disease. *Prog. Med. Virol.* 1993; 40:82-106.

32. Tang D. C., DeVit M., Johnston S. A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*. 1992; 356:152-4.

33. Ulmer J. B., Donnelly J. J., Parker S. E. et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. 1993; 259:1745-9.

34. Wang R., Doolan D.L., Le T.P., Hedstrom R.C., Coonan K.M., Charoenvit Y. et al. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science*. 1998; 282(5388):476-80.

35. Wang Y., Xiang Z., Pasquini S., Ertl H.C. Immune response to neonatal genetic immunization. *Virology*. 1997; 228(2):278-84.

36. Wolff J. A., Malone R. W., Williams P. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*. 1990; 247:1465-8.

37. World survey of rabies: No. 32 for the year 1996. Geneva: World Health Organization; 1998. (WHO/EMC/ZDI/98.4).

38. Xiang Z.Q., Pasquini S., Ertl H.C. Induction of genital immunity by DNA priming and intranasal booster immunization with a replication-defective adenoviral recombinant. *J. Immunol.* 1999; 162:6716-23.

39. Xiang Z.Q., Spitalnik S., Tran M. et al. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology*. 1994; 199:132-40.

40. Xiang Z.Q., Spitalnik S.L., Cheng J., Erikson J., Wojczyk B., Ertl H.C.J. Immune response to nucleic acid vaccines to rabies virus. *Virology*. 1995; 209:569-79.

I.V.Tuchkov, A.K.Nikiforov

#### Antirabies DNA Immunization

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Cited are literary data related to the development of DNA vaccines against rabies virus. Research results regarding gene vaccination of different models of laboratory animals and different ways of vaccine introduction are presented. Possibility to potentiate immunogenicity of DNA vaccines using adjuvants and cytokines is considered. Ways of improving of polynucleotide vaccines are discussed.

**Key words:** rabies, DNA vaccines, polynucleotide vaccines.

#### Об авторах:

Тучков И.В., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

#### Authors:

Tuchkov I.V., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 23.10.09.