

А.А.Бывалов<sup>1</sup>, В.В.Кутырев<sup>2</sup>**ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИГЕНОВ *YERSINIA PESTIS* ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ЧУМНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ**<sup>1</sup>Учреждение Российской академии наук Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар;<sup>2</sup>ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В обзоре рассматриваются вопросы истории и современного состояния проблемы разработки чумной химической вакцины. Представлены данные литературы о протективности ряда «моноантигенов» *Yersinia pestis*, иммуногенных свойствах комплексных антигенных препаратов. Оцениваются возможность и целесообразность создания соответствующих вакцинных препаратов, их предполагаемое место и значимость в противозидемической практике применения средств специфической профилактики чумы.

*Ключевые слова:* чума, химическая вакцина, антиген, протективность, иммунизация.

Впервые идею создания химических вакцин выдвинул обосновал Н.Ф.Гамалея, исходивший из того, что лишь ограниченное число антигенов микробной клетки может индуцировать формирование иммунитета, остальные компоненты бактерии являются балластом или даже тормозят развитие резистентности. Использование в качестве иммунизирующей субстанции лишь очищенных протективных антигенов без примесей инертных или токсичных веществ позволило бы обеспечить защитную эффективность и минимальную реактогенность вакцинного препарата. Практическая реализация этой идеи в последующие десятилетия привела к созданию вакцин нового типа – химических (молекулярных, субъединичных), к которым можно отнести и анатоксины. К настоящему времени в России и за рубежом получены или находятся в стадии экспериментальной проверки молекулярные вакцины против многих инфекционных заболеваний бактериальной, вирусной и иной природы. Многочисленные исследования, направленные на разработку чумной химической вакцины, до настоящего времени не увенчались успехом.

Конструирование химической вакцины предполагает проведение комплексных исследований, направленных, в первую очередь, на выбор антигенной основы препарата, отработку формы, схемы применения и технологии его приготовления. Первая из указанных задач применительно к созданию чумной химической вакцины является наиболее важной и сложной.

Несмотря на то, что к настоящему времени выявлено уже не менее 6–8 антигенов *Yersinia pestis*, которые в той или иной мере признаются протективными в отношении экспериментальной чумы лабораторных животных, целенаправленные исследования по созданию чумной химической вакцины проводились с использованием лишь некоторых из них.

Многолетний опыт идентификации, выделения и изучения иммунобиологических свойств антигенов чумного микроба указывает на необходимость включения в состав названного вакцинного препарата фракции I (F1-антигена), впервые выделенной в очищенном виде и охарактеризованной американ-

скими исследователями под руководством К.Ф.Мeyer [13, 18, 19, 22, 23]. Ими были изучены иммуногенные свойства фракции I на экспериментальных животных [13, 18, 19], а также на добровольцах [22, 23]. Были показаны протективность F1-антигена для мышей, крыс и, в существенно меньшей степени, морских свинок и низших приматов, его способность вызывать выраженный гуморальный ответ, а также возможность пассивной защиты мышей с помощью комплементарных антител. Кроме того, этими исследователями решающим фактором эффективности иммунизации убитой чумной вакциной признавалось наличие в препарате достаточного (2–3 мг) количества фракции I, а живой вакциной – способность к продукции антигена F1 в таком количестве *in vivo* [23]. Вышеприведенные данные, а также высокий авторитет К.Ф.Мeyer среди исследователей, занимавшихся чумой в 50–60-е годы прошлого века, позволили считать целесообразным создание чумной химической вакцины, предназначенной для первичной иммунизации, на основе F1-антигена. Однако последующий анализ уже имевшегося экспериментального материала и результаты проводившихся позднее исследований поставили под сомнение эту точку зрения. Против создания такого препарата говорили следующие факты: необходимость многократного введения антигена для создания достаточно напряженного иммунитета (исключение – мыши), низкая эффективность для предупреждения первично легочной чумы [17], получение новых прямых (идентификация и установление протективности V-антигена [20]) и косвенных (высокая иммуногенность живых культур чумного и псевдотуберкулезного микробов, не продуцирующих F1-антиген) доказательств сложности, многокомпонентности механизмов иммуногенеза к возбудителю чумы. По этим причинам от идеи создания чумной химической вакцины с использованием в качестве протективной основы лишь фракции I в конце концов пришлось отказаться.

Вместе с тем известно, что сложно добиться повышения уровня иммунитета посредством повторной прививки живой чумной вакцины в ранние сроки после первичной иммунизации вследствие

низкой приживаемости в организме микробов вакцинного штамма [9]. До настоящего времени нет единого мнения о схеме иммунизации людей живой вакциной в той или иной эпидемической ситуации. Ревакцинация экспериментальных животных с помощью отдельных антигенных препаратов, содержащих фракцию I *Y. pestis*, напротив, может существенно усилить грунд-иммунитет, обусловленный прививкой живой чумной вакцины [1, 9]. Кроме того, специфическая резистентность к инфекции, в том числе и к чумной, в случае иммунизации протективными антигенами развивается быстрее, чем при введении жизнеспособных клеток соответствующего вакцинного штамма [10], что имеет большое значение при необходимости в сжатые сроки обеспечить невосприимчивость к тому или иному заболеванию определенного контингента людей. Эти и иные обстоятельства послужили основанием для проведения работ по созданию чумной химической вакцины, предназначенной для ревакцинации людей, первично привитых живой чумной вакциной.

Такие исследования проводились в нескольких лабораториях России. Специалистами РосНИПЧИ «Микроб» предложен сухой несорбированный стерилизованный с помощью ионизирующего облучения препарат, включающий фракцию I и основной соматический антиген (ОСА). Необходимость включения ОСА в состав препарата авторы обосновывают его способностью стимулировать иммуногенность фракции I, а также собственной протективностью антигена для морских свинок [4, 5]. Выраженные ревакцинирующие свойства комплексного препарата F1+ОСА были показаны для морских свинок [5] и обезьян павианов гамадрилов [6], грундиммунизированных живой вакциной. В ходе клинических испытаний были установлены иммуногенность (по такому косвенному показателю, как концентрация сывороточных антител к фракции I), а также меньшая по сравнению с живой вакциной реактогенность (по уровню общих и местных реакций) препарата F1+ОСА, введенного волонтерам подкожно через 6 мес после иммунизации живой вакциной [7].

В отличие от вакцины, предлагаемой специалистами РосНИПЧИ «Микроб», в 48 ЦНИИ Минобороны России разрабатывался препарат, включавший из числа антигенов *Y. pestis* лишь фракцию I. Ревакцинация адъювантной формой F1-антигена морских свинок [9] и павианов гамадрилов [1], первично привитых живой чумной вакциной, обеспечивала резкую стимуляцию специфической невосприимчивости животных к чуме. Так, подкожное введение 2 мг фракции I на геле гидроксида алюминия через 6 месяцев после ингаляционной прививки живой вакцины повысило напряженность иммунитета к первично легочной чуме по показателю LD<sub>50</sub> приблизительно в 4 и 2 раза больше по сравнению с бустерной иммунизацией живой вакциной ингаляционным и подкожным способами соответственно [1].

Специалистами РосНИПЧИ «Микроб» и 48

ЦНИИ Минобороны России были проведены сравнительные испытания иммуногенности двух вышеуказанных препаратов химических вакцин. Ревакцинация павианов гамадрилов, первично ингаляционно привитых живой чумной вакциной, показала, что наилучший защитный эффект в отношении аэрогенного заражения культурой возбудителя чумы достигается при подкожном бустерном введении живой и химической вакцин, изготовленных в 48 ЦНИИ Минобороны России [6]. Меньший бустерный эффект комплексного антигенного препарата (Ф1+ОСА) объясняется, по-видимому, несколькими причинами: более низким содержанием в препарате фракции I, отсутствием адъюванта (моноантигенный препарат был сорбирован в геле гидроксида алюминия), использованием для стерилизации ионизирующего облучения, а не микрофльтрации, применением более «жесткого» способа выделения F1-антигена по ранее описанному методу [14]. Два последних обстоятельства могли вызывать получение F1-антигена в более деполимеризованной, а значит и менее иммуногенной форме.

Несмотря на вышеизложенное, способность указанных препаратов (F1 или F1+ОСА) вызывать приемлемый уровень иммунитета лишь для животных (и, по-видимому, для человека), грундиммунизированных живой вакциной, их неэффективность в отношении бескапсульных вариантов *Y. pestis*, а также, хотя и редко, выделяются в природных очагах чумы [8] и могут вызывать заболевание человека [29], а также появление новых данных, свидетельствующих о возможности создания химической вакцины, которая бы могла использоваться в том числе и для первичной иммунизации, остановили дальнейшие исследования в этом направлении.

В настоящее время внимание исследователей, занимающихся проблемами вакцинопрофилактики чумы, привлечено к созданию химической вакцины, пригодной для первичной иммунизации людей и включающей наряду с фракцией I другие протективные антигены. Частичная защита мышей от чумы по выживаемости или срокам гибели показана для ряда антигенов (кроме F1), в том числе V, Yop D, Ypk A, Ysc F, Yad C, Opp A [21]. Среди них особое место занимает V-антиген (Lcr V), идентифицированный и выделенный в относительно чистом виде в 50–60-х годах прошлого века [16, 20]. Как показали результаты исследований последних лет, Lcr V как фактор патогенности иерсиний характеризуется широким спектром биологического действия на организм хозяина. Этот антиген, являясь одним из основных структурно-функциональных компонентов инъектосомы, формируемой чумным микробом при попадании в инфицируемый организм, участвует в транслокации в эукариотическую клетку-мишень (дендритные клетки, нейтрофилы, макрофаги) эффекторных белков. С помощью этой системы секреции III типа чумной микроб ингибирует фагоцитарную реакцию хозяина путем нарушения механизмов сигнализации,

препятствует защитным цитоскелетным перестройкам и др. [21]. Кроме того, сам по себе антиген Lcr V в условиях *in vitro* способен нарушать хемотаксис нейтрофилов [28], активировать опосредованное Toll-подобным рецептором TLR-2 продуцирование противовоспалительного цитокина IL-10, тем самым оказывая иммуносупрессорное действие на клеточный иммунитет [15, 25].

Возможность инактивации иммунным макроорганизмом указанной активности чумного микроба определяет целесообразность включения Lcr V в состав разрабатываемой химической вакцины. В опытах на лабораторных животных была установлена способность Lcr V вызывать активную защиту мышей, а поли- или моноклональных антител – пассивную защиту от чумной инфекции.

Экспериментальные данные, свидетельствующие о высокой значимости антигенов F1 и V в иммуногенезе и патогенезе чумы, послужили основанием для конструирования химической вакцины на основе двух указанных антигенов. Такие разработки проводятся в нескольких лабораториях Западной Европы и США. Антигены F1 и V, используемые в составе вакцинных препаратов, получают из культур чумных микробов, рекомбинантных штаммов бактерий, в виде белков слияния. Получены убедительные доказательства протективности препаратов, включающих антигены F1 и V, для мышей, морских свинок [27], макак циномогус [цит. по 26], причем, защитный эффект показан в отношении как бубонной, так и первично легочной чумы, вызываемой дикими штаммами возбудителя. Кроме того, за счет V-антигена комплексный препарат индуцирует защиту и от инфицирования культурой бескапсульного штамма *Y. pestis* [11].

Результаты доклинического изучения препаратов на основе антигенов F1 и V позволили разработчикам перейти к клиническим испытаниям, в ходе которых должны быть отработаны схема, способ введения, одна человеко-доза, состав финальной формы препарата [26]. Предположительно, первичная иммунизация людей должна включать двукратную инъекцию вакцины с интервалом в три недели [27]. Однако уже на стадии разработки данного препарата можно говорить о вероятных ограничениях в эффективности его применения на людях. Во-первых, показана вариабельность структуры V-антигена у различных вирулентных штаммов *Y. pestis*, определяющая пониженную протективность V-антигена или V-антител в отношении возбудителя чумы с иным серовариантом данного антигена [12, 24]. Во-вторых, выявлена маловыраженная протективность комплекса антигенов F1 и V для африканских зеленых мартышек, использованных разработчиками в качестве одного из модельных видов животных. Вместе с тем сейчас нет оснований утверждать, что приматы этого вида являются менее адекватной моделью человека при оценке патогенеза заболевания по сравнению с обезьянами *M. cynomolgus*, для которых препарат F1+V

является эффективным иммуногеном.

В-третьих, конструирование всех препаратов химической вакцины на основе отдельных «моноантигенов» *Y. pestis* связано с неопределенными ожиданиями в отношении выраженности их иммунизаторного действия на организм человека. Как было указано выше, даже среди полипептидов чумного микроба выявлено уже не менее 6 антигенов, в той или иной мере вызывающих защиту мышей от чумы. И вопрос о наличии в вакцинном препарате достаточного количества антигенов F1 и V или целесообразности изменения (расширения) его состава для индукции необходимого уровня специфической невосприимчивости к чуме у человека может быть решен после экспериментального обоснования надежных косвенных критериев напряженности иммунитета. Такие исследования в настоящее время проводятся.

Второй разрабатываемый препарат чумной химической вакцины, предназначенной для первичной иммунизации, включает антигены F1 и Б. Б-антиген представляет собой высокомолекулярный антиген, способный экскретироваться в питательную среду при глубинном культивировании микробов *Y. pseudotuberculosis*, но не *Y. pestis*. В его состав входят полисахаридная, липидная и полипептидная составляющие, достаточно прочно связанные между собой, как показали результаты исследования препаратов Б-антигена, выделенных аффинной колоночной хроматографией с использованием в качестве лиганда иммуноглобулинов истощенной Б-антисыворотки или моноклональных антител к антигену. Б-антиген протективен для морских свинок (но не белых мышей), зараженных культурами капсулообразующего и бескапсульного штаммов *Y. pestis* [2]. Первичная иммунизация комплексом антигенов F1 и Б индуцирует защиту от бубонной чумы мышей, а также морских свинок и обезьян павианов гамадрилов от аэрогенного инфицирования возбудителем чумы [2, 3]. В настоящее время проводятся доклинические исследования, связанные с дальнейшей оценкой биохимических и иммунобиологических (эпитопная оснащенность, побочное действие и др.) свойств Б-антигена.

Таким образом, создание чумной химической вакцины признается одним из основных направлений совершенствования системы специфической профилактики чумы. На сегодняшний день выявлены и выделены несколько антигенов, активная иммунизация препаратами которых вызывает развитие специфической невосприимчивости к чуме у экспериментальных животных. Результаты доклинических и клинических исследований разрабатываемых на их основе химических вакцин покажут, смогут ли они по совокупности потребительских качеств вытеснить применяющиеся живые и убитые чумные вакцины, станут они альтернативным средством вакцинопрофилактики чумы или будут использоваться в сочетании с принятыми вакцинами во вновь обоснованных схемах иммунизации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бывалов А.А., Паутов В.Н., Чичерин Ю.В. и др. Эффективность ревакцинации павианов гамадрилов чумной живой сухой вакциной НИИС и фракцией чумного микроба. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1984, 4:74–6.
2. Бывалов А.А., Дармов И.В., Евстигнеев В.И., Пименов Е.В. Идентификация и выделение антигена, защищающего морских свинок от экспериментальной чумы. Пробл. особо опасных инф. 2005; 3(89):54–8.
3. Бывалов А.А., Дубровин М.Ю., Елагин Г.Д. и др. Зависимость между уровнем сероперестройки вакцинированных животных и напряженностью иммунитета к экспериментальной чуме. Клин. лабораторная диагн. 2007; 7:48–51.
4. Дальвадяню С.М., Пономарев Н.Г., Зубова М.В. Некоторые данные родства основного соматического антигена R-форм бактерий чумы и псевдотуберкулеза. Пробл. особо опасных инф. 1971; 3(19):81–4.
5. Дальвадяню С.М., Пономарев Н.Г., Белобородов Р.А. и др. Использование фракции I и основного соматического антигена для активации противочумного иммунитета у морских свинок. В кн.: Состояние и перспективы профилактики чумы. Тез. докл. на Всесоюз. конф. Саратов, 1978. С. 158–9.
6. Дальвадяню С.М., Дубровин М.Ю., Бывалов А.А. и др. Исследования по иммунизации против чумы. Сообщение 3. Ревакцинирующие свойства живой чумной вакцины и препаратов чумных химических вакцин для павианов гамадрилов. Пробл. особо опасных инф. 2005, 1(89):62–7.
7. Дальвадяню С.М., Дятлов И.А., Еремин С.А. и др. Исследования по иммунизации против чумы. Сообщение 4. Опыт ревакцинации волонтеров «химической» и живой чумной вакцинами. Пробл. особо опасных инф. 2006; 1(91):57–61.
8. Кондрашкина К.И., Лапина Н.Ф., Кураев И.И. и др. О возможности циркуляции в природе некоторых атипичных штаммов чумного микроба. Пробл. особо опасных инф. 1971; 3(19):63–9.
9. Лебединский В.А., Чичерин Ю.В., Паутов В.Н. и др. Опыт использования фракции I чумного микроба для ревакцинации экспериментальных животных. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1982; 5:60–3.
10. Шмеркевич Д.Л. Эффективность различных иммуногенных препаратов чумного микроба для белых мышей и морских свинок. Пробл. особо опасн. инф. 1968; 3:52–7.
11. Anderson G.W.Jr., Leary S.E.C., Williamson E.D. et al. Recombinant V antigen protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by F1-capsule-positive and -negative strains of *Yersinia pestis*. Infect. Immun. 1996; 64(11):4580–5.
12. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 17(2):434–64.
13. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E. et al. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1947; 64:139–45.
14. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E. et al. Studies on immunization against plague. I. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis*. J. Immunol. 1952; 68(2):131–45.
15. Brubaker R.R. Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to *Yersinia*: roles of Yops and LcrV (V antigen). Infect. Immun. 2003; 71(7):3673–81.
16. Burrows T.W., Bacon G.A. The basis of virulence in *Pasteurella pestis*: an antigen determining virulence. Br. J. Exp. Pathol. 1956; 37(5):481–93.
17. Burrows T.W. Virulence of *Pasteurella pestis* and immunity to plague. Ergeb. Microbiol. Immunitätsforsch Exp. Ther. 1963; 37:59–113.
18. Chen T.H., Foster L.E., Meyer K.F. Comparison of the immune response to three different *Yersinia pestis* vaccines in guinea pigs and langurs. J. Infect. Dis. 1974; 129 (Suppl.):S53–61.
19. Ehrenkranz N.J., Meyer K.F. J. Infect. Diseases. 1955; 96, 138–44.
20. Lawton W.D., Erdman R.L., Surgalla M.J. Biosynthesis and purification of V and W antigen in *Pasteurella pestis*. J. Immunol. 1963; 91:179–84.
21. Li B., Yang R. Interaction between *Yersinia pestis* and the host immune system. Infect. Immun. 2008; 76(5):1804–11.
22. Meyer K.F., Foster L.E. Measurement of protective serum antibodies in human volunteers inoculated with plague prophylactics. Stanford Med. Bull. 1948; 6(1):75–9.
23. Meyer K.F. Recent studies on the immunity response to administration of different plague vaccines. Bull. WHO. 1953; 9(5):619–36.
24. Roggenkamp A., Geiger A.M., Leitritz L. et al. Passive immunity to infection with *Yersinia spp.* mediated by anti-recombinant V antigen is dependent on polymorphism of V antigen. Infect. Immun. 1997; 65(2):446–51.
25. Sing A., Rost D., Tvardovskaia N. et al. *Yersinia* V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. J. Exp. Med. 2002; 196(8):1017–24.
26. Smiley S.T. Current challenges in the development of vaccines for pneumonic plague. Expert Rev. Vaccines. 2008; 7(2):209–21.
27. Titball R.W., Williamson E.D. Second and third generation plague vaccines. Adv. Exp. Med. Biol. 2003; 529:397–406.
28. Welkos S., Friedlander A., McDowell D. et al. V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis. Microb. Pathog. 1998; 24(3):185–96.
29. Winter C.C., Cherry W.B., Moody M.D. An unusual strain of *Pasteurella pestis* isolated from a fatal human case of plague. Bull. WHO. 1960; 23:408–10.

A.A.Byvalov, V.V.Kutyrev

#### The Experience of Application of *Yersinia pestis* Antigens for Plague Chemical Vaccine Development

*Institute of Physiology, Komi Science Centre, the Urals Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar; Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov*

The review presents data on history and current status of the problem of chemical plague vaccine development. Literature data about protective activity of some *Yersinia pestis* "monoantigens" as well as immunogenic properties of complex antigen preparations are summarized. The possibility and expediency of development of the appropriate vaccine preparations are evaluated, including their potential role and significance for the specific plague prophylaxis as the anti-epidemic measure.

*Key words:* plague, chemical vaccine, antigen, protective activity, immunization.

#### Об авторах:

*Бывалов А.А.* Учреждение Российской академии наук Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар.

*Кутырев В.В.* Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

#### Authors:

*Byvalov A.A.* Institute of Physiology, Komi Science Centre, the Urals Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar.

*Kutyrev V.V.* Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 20.08.10.