

ОПЫТ СОЗДАНИЯ ИННОВАЦИОННЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА БАЗЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСПРЕССИОННЫХ СИСТЕМ

Р.К. Саляев¹, Н.И. Рекославская^{1,2}, А.С. Столбиков¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, salyaev@sifibr.irk.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

Аннотация. Изложен 17-летний опыт разработки инновационных вакцин, создаваемых на основе растительных экспрессионных систем против опасных вирусных инфекций. Приведены данные о разработке кандидатной вакцины одновременно против ВИЧ и гепатита В, а также против опасных папилломатозов: цервикального рака и аногенитальных папилломавирусных инфекций.

Ключевые слова: ВИЧ/гепатит, папилломавирусы, цервикальный рак, аногенитальные папилломатозы, вакцины на основе растений

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-21-25

Введение

В конце 19 века в мировой науке была разработана концепция новых вакцин, которые тогда назывались "съедобными", потому что создавались на основе трансгенных растений, в которые методами генной инженерии вводились гены, кодирующие синтез антигенных белков возбудителей того или иного заболевания. На основе этой концепции были опробованы различные растительные экспрессионные системы и сейчас уже получены сотни кандидатных и реально действующих вакцин, созданных на базе трансгенных растений.

Растительные экспрессионные системы привлекают тем, что они дают меньше побочных эффектов, вакцинация осуществляется перорально, транспортировка и хранение происходят при обычной температуре. Во многих случаях вакцины более дешевы и не вызывают аллергических реакций организма.

Начиная с 2000 года, авторы проводят исследования по оптимизации получения пероральных вакцин на основе растительных экспрессионных систем против опасных вирусных заболеваний. Так, в 2001-2007 годах в совместной работе с ГНЦ ВБ "Вектор", Институтом химической биологии и экспериментальной медицины СО РАН и Лабораторией Молекулярной патологии растений (Белтсвилл, США) по международному гранту МНТЦ были выполнены исследования по разработке бинарной пероральной вакцины на основе трансгенных растений одновременно против СПИДа и гепатита В. Затем, по инициативе МНТЦ, выполнена аналогичная работа по созданию двух вариантов кандидатной вакцины против гепатита В.

С 2008 года и по настоящее время авторы работают над созданием инновационных профилактических и терапевтических вакцин против опасных папилломатозов: цервикального рака и аногенитальных кондилом.

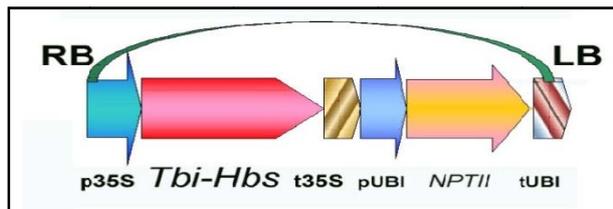
Результаты

1. Кандидатная вакцина против СПИДа и гепатита В.

При разработке генетической конструкции в качестве целевого использовался гибридный ген ТВ1-NBS, кодирующий синтез антигенных белков ВИЧ-1 и гепатита В.

В конструкции также присутствовал ген устойчивости к канамицину (рис. 1).

Рис. 1. Генетическая конструкция с геном TBI-HBS (ВИЧ-1 и гепатит В)

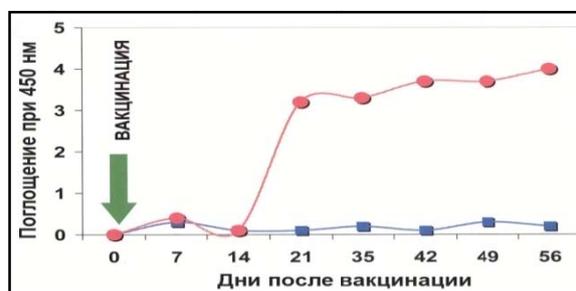


После генетической трансформации растений томат получили в плодах следующие количества антигенных белков:

TBI (по p24) = 0.5 -10 нг/мг ОРБ, HBS (по HBSAg) - 4,8-25,91 нг/мг ОРБ .

Проверку эффективности вакцинации проводили на лабораторных мышах путем перорального введения вакцинного материала по 500 мг на мышшь. В дальнейшем отбирали пробы крови через определенные интервалы времени с последующим иммуноферментным анализом антител. На рис. 2 видна динамика синтеза антител в течение 56 дней. Аналогичные результаты были получены и по синтезу антител против гепатита В.

Рис. 2. Динамика синтеза антител после вакцинации мышей TBI-HBS

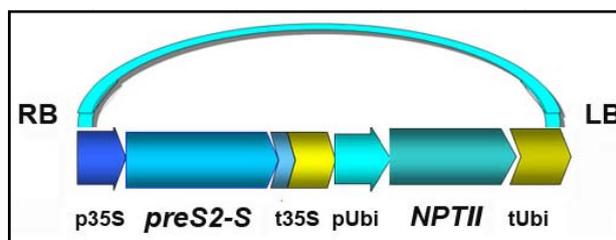


Таким образом, к 2006-2008 годам была впервые разработана кандидатная вакцина против СПИДа и гепатита В в растительной экспрессионной системе [Shchelkunov et al., 2006; Salyaev et al., 2009].

После завершения этой работы от МНТЦ было получено предложение разработать ещё одну вакцину специально для профилактики гепатита В. В качестве целевого гена был выбран ген PreS2-S оболочки вируса гепатита В.

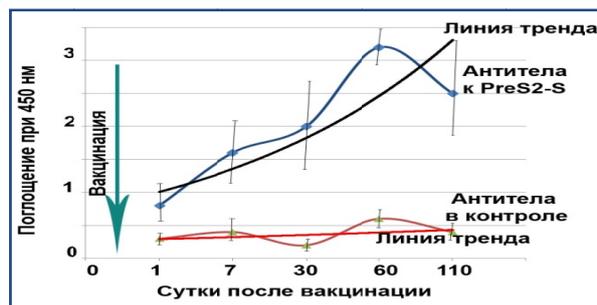
Генетическая конструкция создавалась по тому же принципу, что и ранее (рис. 3).

Рис. 3. Генетическая конструкция с геном preS2-S



После генетической трансформации томата выход антигенного белка PpreS2-S составил 130-270 нг/мг ОРБ. Проверка иммуногенности вакцины на мышах по количеству антител к PreS2-S показала достаточный синтез антител в крови мышей (рис.4). На этом наша работа с МНТЦ была завершена.

Рис. 4. Динамика синтеза антител в сыворотке крови мышей после вакцинации материалом плодов томата с PreS2-S в течение 110 суток

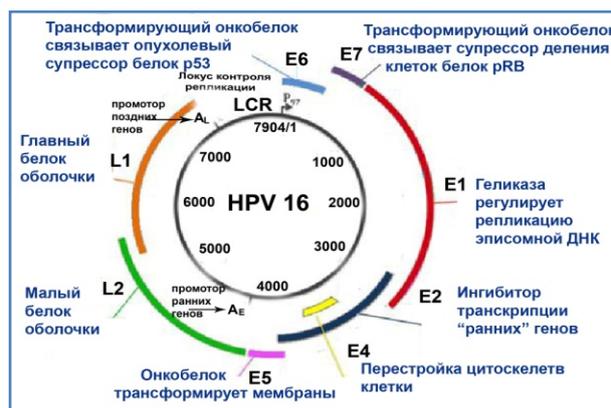


2. Кандидатные вакцины против вирусов папилломы человека

Типов папиллом много: около 200. Среди папилломавирусов есть и очень опасные. Имеется целая группа вирусов папилломы, вызывающих раковые заболевания, в частности, рак шейки матки, рак легочных тканей и носоглотки. Рак шейки матки особенно опасен, так как его встречаемость занимает второе место после рака грудной железы. По данным ВОЗ, инфицировано онкогенными вирусами около 10 % женщин.

Так называемые аногенитальные папилломатозы тоже представляют собой крайне неприятные бородавочные скопления в области промежности. Они тоже вызываются соответствующими типами вируса папилломы человека. Схема онкогенного типа вируса человека показан на рис. 5.

Рис. 5. Физическая карта вируса папилломы человека тип ВПЧ16 с обозначением функций генов



Первая часть нашей работы, проводимой с 2008 года, заключалась в разработке и усовершенствовании кандидатной вакцины против рака шейки матки, вызываемого наиболее онкогенным вирусом ВПЧ16.

Предыдущий опыт работы с ядерной генетической трансформацией томата выявил определенные трудности при создании вакцины, которые выражались в недостаточно интенсивном синтезе антигенных белков. Поэтому значительная часть дальнейшей работы была посвящена использованию различных методов интенсификации синтеза антигенов разными типами энхансеров и вирусных регуляторных элементов. В настоящем докладе я не привожу этих исследований, поскольку они будут изложены в двух докладах нашей конференции: в докладе Н.И. Рекославской и в докладе А.С. Столбикова (см. в секции № 4). Скажу только о том, что в итоге этих исследований удалось многократно увеличить выход антигенных белков при ядерной трансформации (таблица).

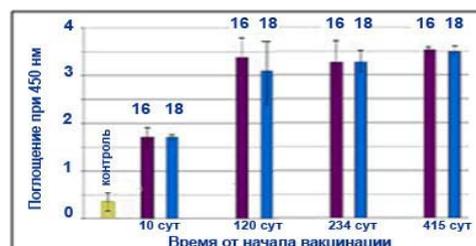
Таблица.

Сравнение эффективности трансформации различными генетическими конструкциями на примере HPV16 L1

№ , Варианты конструкций	Выход антигенного белка, нг/мг ОРБ
1. Стандарт (на примере p35S TBI-HBS)	0,5-10 (по p24), 70-230 (по HBS)
2. p35S HPV16 L1 Ω5'НТО ВТМ	283-2330
3. p35S RdRP (PHK2a,b) TEV 5'НТО HPV16 L1	25000 (экстракт) - 204000 (сок плода)
4. pRB94 5'НТО tRNA f-M rps14 p35S TEV5'НТО prrm16S HPV16L1 psbA 3'НТО (биобаллистика)	1800-5300

В итоге были разработаны две кандидатные вакцины на основе наиболее онкогенных типов папилломы человека ВПЧ16 и ВПЧ18. Иммуногенность вакцин при этом была также достаточно высокой (рис. 6).

Рис. 6. ИФА содержания антител к ВПЧ16 L1 и ВПЧ18 L1 в сыворотке крови вакцинированных мышей.



Контроль - сыворотка крови контрольных мышей,
16 - вариант антител к ВПЧ16 L1,
18 - вариант антител к ВПЧ18 L1
сыворотки крови мышей

Опираясь на эти исследования, был заключен контракт с одной из крупных фармацевтических фирм на создание четырехкомпонентной вакцины против цервикального рака и разработку лабораторного регламента ее получения. Через 3 года вакцина была разработана и фирме передан ряд партий вакцины для доклинических испытаний, а также лабораторный регламент ее получения и заявка на патент.

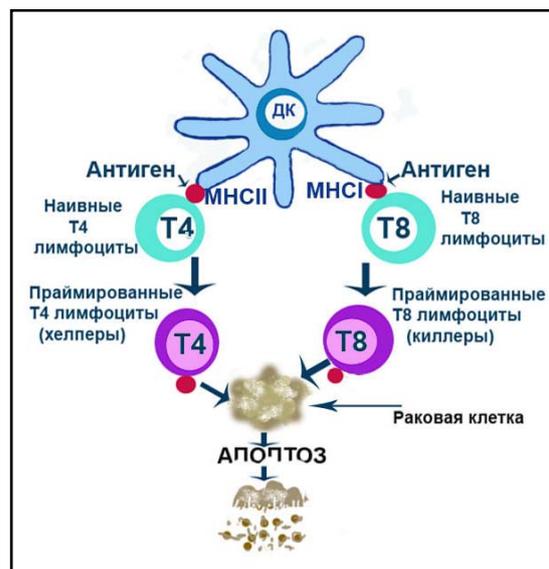
В настоящее время наши исследования ведутся в 2-х направлениях:

1. Исследование возможности создания терапевтической вакцины против цервикального рака на базе растительной экспрессионной системы, используя "ранние" гены ВПЧ16 E2, ВПЧ16 E6 и ВПЧ16 E7 (рис. 5), которые, судя по научной литературе, могут служить основой для разработки такой вакцины [Lin et al., 2010; Burg, 2012]. В этом случае центр исследований будет включать изучение степени активации Т лимфоцитов: киллеров CD8⁺ и хелперов CD4⁺, которые после активации приобретают способность узнавать раковые клетки и вызывать их разрушение путем апоптоза (рис. 7).

Рис. 7. Схема активации Т лимфоцитов Антигенными "ранними" белками ВПЧ.

Обозначения:

ДК - дендритная клетка, Т4 - CD4⁺ лимфоцит,
Т8 - CD8⁺ лимфоцит,
МНС I и МНС II - главные комплексы гистосовместимости классов I и II,
РК - раковая клетка



Эта работа находится на начальных этапах: разрабатывается дизайн генетических конструкций, осуществляется их синтез и составляются программы экспериментов в различных модельных условиях.

2. Разработка профилактической 2-х или 3-х компонентной вакцины, пригодной для пероральной профилактики против опасных аногенитальных папилломатозов и цервикального рака.

Данная вакцина сейчас в работе: синтезированы и проверены на синтез антигенных белков генетические конструкции, в настоящее время нарабатывается вакцинный материал для дальнейших экспериментов и изучения его иммуногенности на лабораторных животных.

Литература

Shchelkunov S.N., Salyaev R.K., Posdnyakov S.G., Rekoslavskaya N.I. et al. Immunogenicity of a novel, bivalent, plant-based oral vaccine against hepatitis B and human immunodeficiency viruses // *Biotechnol. Letters*. – 2006. – V. 28, № 6. – P. 959–967.

Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S., Hammond R.W., Shchelkunov S.N. Retention of the ability to synthesize HIV-1 and HBV antigens in generations of tomato plants transgenic for the TBI-HBS gene // *Doklady Biochemistry Biophysics*. – 2009. – V. 425, № 1 – P. 120–123.

Lin K., Roosinovich E., Ma B., Hung C.-F., Wu T.-C. Therapeutic HPV DNA vaccines // *Immunol. Res.* – 2010. – V. 47, № 1-3. – P. 8–12.

Burg van der S.H. Immunotherapy of human papilloma virus induced disease // *The Open Virol. J.* – 2012. – V. 6. – P. 257–263.

THE EXPERIENCE OF THE CREATION OF INNOVATIVE VACCINES AGAINST DANGEROUS VIRAL DISEASES ON THE BASE OF PLANT EXPRESSION SYSTEMS

R.K. Salyaev¹, N.I. Rekoslavskaya^{1,2}, A.S. Stolbikov¹

¹Siberian institute of plant physiology and biochemistry of SB RAS, Irkutsk, Russia, salyaev@sifibr.irk.ru

²The Irkutsk Scientific Center, SB RAS, Irkutsk, Russia

Abstract. There are presented the 17th years experiences of the development of innovative vaccines, created on the base of plant expression systems against dangerous viral infections. The data of the development of candidate vaccines simultaneously against HIV-1 and hepatitis B as well as against dangerous papillomatoses: cervical cancer and anogenital papillomaviral infections are considered.

Keywords: *HIV-1/hepatitis B, papillomaviruses, cervical cancer, anogenital papillomatoses, plant based vaccines*