

С. Н. ЩЕЛКУНОВ



# ВИРУС

## натуральной оспы: ЗЛО ВО БЛАГО

Скульптурная модель вируса натуральной оспы.  
Стекло. Худ. Л. Джеррам

ЩЕЛКУНОВ Сергей Николаевич – доктор биологических наук, академик РАН, заведующий отделом геномных исследований и разработки методов ДНК-диагностики поксвирусов ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Новосибирская обл.), профессор кафедры молекулярной биологии Новосибирского государственного университета. Лауреат премии правительства РФ (2005). Автор и соавтор более 200 научных публикаций.

*Вплоть до открытий Антони ван Левенгука в XVII в. человечество и не подозревало, что живет в среде, наполненной множеством разнообразных мельчайших существ. Эти микроорганизмы настолько малы, что их можно увидеть, лишь вооружившись хорошим микроскопом: оптическим – для изучения бактерий и других одноклеточных, сложным и дорогим электронным – для получения «портретов» вирусов. Большинство микроорганизмов сосуществует с человеком и животными вполне миролюбиво, а многие – и на взаимовыгодных началах, однако некоторые из них нарушают «мирный договор», переходя в разряд болезнетворных. Удивительно, но способность таких патогенных микроорганизмов преодолевать защитные системы организма хозяина можно использовать нам во благо. Особый интерес для современной медицинской биотехнологии представляют высокопатогенные вирусы, такие как вирус натуральной оспы, для которых человек является единственным хозяином. На основе белков этих вирусов сегодня создаются препараты для лечения тяжелых хронических воспалительных заболеваний неинфекционной, в том числе аутоиммунной, природы*

**Ключевые слова:** вирус натуральной оспы, антагонисты цитокинов, иммуномодуляция, аутоиммунные заболевания, белковая терапия.

**Key words:** smallpox virus, cytokine antagonists, immunomodulation, autoimmune diseases, protein therapy

© С. Н. Щелкунов, 2013



**М**икроорганизмы обитают везде: в воздухе и в воде, в почве и в наших собственных телах... По сравнению с человеком и животными размножаются они чрезвычайно быстро, и их сообщества неизмеримо многочисленнее. Так, если человечество перевести в масштаб микромира, то все 7 млрд человек легко уместились бы в стандартной микробиологической колбе.

Чтобы выжить, человеку, как и другим животным, постоянно приходилось бороться с окружающими его патогенными микроорганизмами. Такие события в эволюционной истории происходили многократно, чем и обусловлено появление и развитие у млекопитающих большого числа защитных механизмов, обеспечивающих их выживание в «микробном бульоне» тонкой биосферной прослойки нашей планеты.

Среди защитных реакций организма самая «быстрая» – *неспецифическая*, т. е. направленная против любых вирусов, микробов и биологических макромолекул. Речь идет о системе *врожденного иммунитета*, настроенной на распознавание и последующее реагирование на молекулярные компоненты микроорганизмов, представляющих угрозу. Важную роль в ранней неспецифической защите организма от инфекции играют хорошо всем знакомые воспалительные процессы, которые препятствуют распространению патогена в первые часы и дни после инфицирования.

Специфическая защита организма против конкретного инфекционного агента – *адаптивный* или *приобретенный иммунитет*, развивается медленнее и представляет собой сложное взаимодействие иммунных клеток разного типа, регулируемое специальными белками.

**ИММУННАЯ ОБОРОНА**

Задача иммунной системы организма – защищать его от любых внешних и внутренних угроз.

**Врожденный иммунитет** неспецифичен – он обеспечивает защиту от любых инфицирующих агентов: вирусов, бактерий, а также макромолекул.

Одной из первых (возможно, и одной из самых древних) линий такой неспецифической защиты является **апоптоз** – программируемое самоубийство клетки. В случае вирусной инфекции апоптоз, индуцируемый в результате молекулярного распознавания специфичных молекул патогена, предотвращает размножение вируса и инфицирование других клеток организма хозяина.

Важную роль в ранней неспецифической защите организма от вирусной инфекции играет **воспаление**, возникающее в первые часы и дни после инфицирования и направленное на ограничение распространения вируса. Клетки врожденной иммунной системы млекопитающих – макрофаги, дендритные клетки и натуральные киллеры, в ответ на инфекцию продуцируют так называемые **провоспалительные цитокины**, такие как интерлейкин-1β (IL-1β), интерлейкин-18 (IL-18), фактор некроза опухолей (TNF) и гамма-интерферон (γ-IFN). В развитии воспалительной реакции участвуют белки и другого класса – **хемокины**, которые регулируют перемещение и функции лейкоцитов.

К дополнительным механизмам врожденного иммунитета можно отнести **комплемент** – многокомпонентный набор сложных белков сыворотки крови, которые являются протеолитическими ферментами, участвующими в инактивации инфекционных агентов и зараженных ими клеток.

Специфическая защита организма против конкретного инфекционного агента – **адаптивный** или **приобретенный иммунитет**, развивается медленнее реакций врожденного иммунитета. Он осуществляется в результате сложного взаимодействия клеток разного типа, контролируемого цитокинами TNF, IL-1β и γ-IFN. Его результат – появление В-лимфоцитов, синтезирующих специфичные противовирусные антитела, и вирусоспецифических цитолитических Т-лимфоцитов. Специфичные антитела могут взаимодействовать с вирусными частицами и их компонентами индивидуально либо в комплексе с комплементом, инактивируя их.

Таким образом, интерлейкин-1β, фактор некроза опухолей и гамма-интерферон являются важнейшими цитокинами, которые, наряду с регулированием воспалительных реакций, контролируют развитие адаптивного иммунного ответа организма на инфекцию.

Все эти системы защищают нас от внешних «агрессоров», однако нарушения в их работе могут приводить к развитию патологических состояний, сопровождающихся хроническими воспалительными и (или) аутоиммунными реакциями, такими как астма, атеросклероз, системная красная волчанка, псориаз, ревматоидный артрит, рассеянный склероз и другие тяжелые болезни, с трудом поддающиеся лечению.

В настоящее время разрабатываются методы так называемой «биологической» терапии подобных заболеваний, основанные на блокировании избыточной активности защитных систем с помощью различных биологических макромолекул. В том числе для этого используют человеческие антитела, способные специфично взаимодействовать и дезактивировать белки врожденной и адаптивной систем иммунитета, сверхсинтез которых и приводит к развитию патологий.

Но что если использовать для этих целей белки патогенных микроорганизмов, таких как вирусы, эволюционно-адаптированных к преодолению защитных систем организма, обернув, образно говоря, зло во благо?

**Патогенный и антропонозный**

Царство вирусов было открыто более ста лет назад выдающимся русским ученым Д. И. Ивановским, однако изучить эти мельчайшие организмы удалось лишь в последние десятилетия благодаря бурному развитию инструментальных методов исследований.

Хотя вирусы очень разнообразны по своей организации и функционированию, все они способны размножаться лишь в клетках других организмов, одноклеточных и многоклеточных. В процессе длительной совместной эволюции с организмом хозяина вирусы постоянно «пробуют» новые варианты подавления защитных реакций хозяина или их «обмана» за счет молекулярной мимикрии. В частности, вирусы могут включать в состав своего генома кодирующие последовательности клеточных генов, участвующих в регулировании иммунных реакций, и модифицировать их, приспособив для обеспечения собственной жизнедеятельности.

Разные вирусы млекопитающих отличаются не только по размеру генома и самих вирусных частиц, но и по стратегии своего развития в организме хозяина. Вирусы различных семейств демонстрируют удивительное разнообразие в механизмах преодоления систем врожденного и адаптивного иммунитета млекопитающих. Поэтому изучение этих особенностей вирусов позволяет выявить новые закономерности организации и функционирования защитных систем животных и человека, обеспечивающих выздоровление после инфицирования болезнетворным агентом.

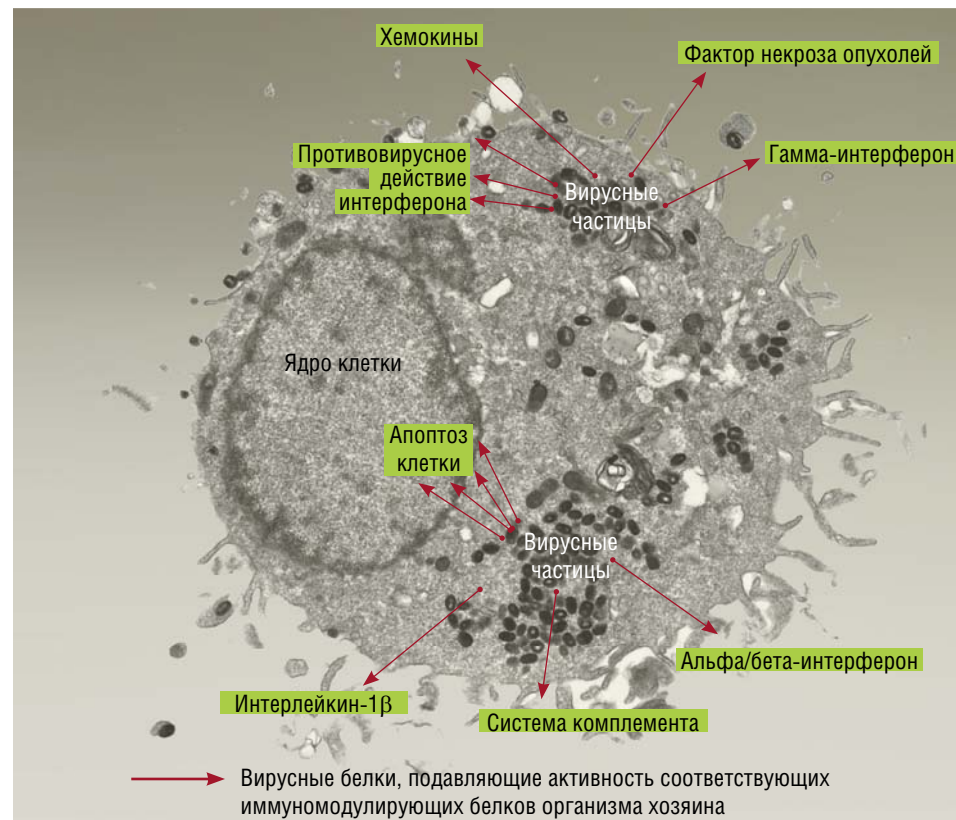
Большинство вирусов способно заражать широкий спектр видов животных (*круг хозяев*). Однако для медицинской биотехнологии особый интерес представляют высокопатогенные и при этом *антропонозные* вирусы, для которых человек является единственным хозяином. В этом случае вирус может очень эффективно подавлять (или «уходить» от атаки) иммунные реакции именно человеческого организма. Генотипические исследования таких вирусов и выявление вирусных белков, эффективно подавляющих развитие воспалительных процессов в ответ на инфекцию, создает предпосылки для создания новых препаратов, предназначенных для лечения хронических воспалительных заболеваний неинфекционной природы.

Удивительный пример высокой патогенности для человека и строгой антропонозности представляет собой *вирус натуральной оспы*. Этот вирус, предположительно, исходно имел широкий круг хозяев, однако в процессе эволюции утратил способность размножаться в организме других млекопитающих, сохраняясь в *эндемичном* (т. е. свойственном только данной местности) состоянии в течение многих столетий в густонаселенных районах, прежде всего, Индийского субконтинента (Щелкунов, 2012).

При этом вирус натуральной оспы не способен находиться в организме человека в латентном состоянии или вызывать хроническую инфекцию – болезнь всегда заканчивается либо выздоровлением, либо гибелью инфицированного. Это снижает вероятность выживания вируса в природе и свидетельствует о том, что он попал в своеобразный эволюционный «тупик»; с другой стороны, размножаясь из поколения в поколение только в организме человека, вирус натуральной оспы максимально приспособился на молекулярном уровне к преодолению многоярусных механизмов врожденного и адаптивного иммунитета человека (Щелкунов, 2011).

Сотрудники ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Новосибирская обл.) первыми в мире расшифровали структуры геномов патогенных для человека вирусов натуральной оспы, оспы коров и оспы обезьян, выделенных от больных людей (Shchelkunov *et al.*, 1993, 1998, 2001). Сравнение геномных стратегий этих вирусов и генов, кодирующих белки-иммуномодуляторы, показало, что все вирусы, относящиеся к семейству поксвирусов (*Poxviridae*), характеризуются наибольшим разнообразием механизмов преодоления защитных иммунных реакций организма человека по сравнению с вирусами других семейств (Shchelkunov, 2012). Вирус натуральной оспы, для которого человек является единственным хозяином, наиболее эффективно по сравнению с другими поксвирусами подавляет активность иммунной системы человека

Поксвирусы, к которым принадлежит вирус натуральной оспы, являются крупнейшими ДНК-содержащими вирусами млекопитающих. Вирусные белки, обладающие иммуномодулирующей активностью, синтезируются на ранних этапах вирусной инфекции. Они остаются в зараженной клетке либо выходят из нее, взаимодействуя с ключевыми белками-регуляторами как врожденного, так и адаптивного иммунитета организма хозяина. Подавляя активность этих белков, вирус обеспечивает зараженной клетке «круговую оборону» от атак иммунной системы хозяина. Клетка клеточной культуры фибробластов здоровой ткани легкого человека, инфицированная вирусом натуральной оспы (штамм Индия-1967). Электронная микроскопия. Фото Е. Рябчиковой



Такие свойства особо опасного вируса натуральной оспы позволили предположить, что его белки можно использовать для терапии различных иммунопатологий человека (Шелкунов, 1995). И сегодня в ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Новосибирская обл.) идет работа над созданием лекарственных препаратов нового поколения на основе белков, секретируемых поксивирусами, к которым принадлежит и вирус натуральной оспы.

## Оружие против воспаления

Как уже упоминалось, главной причиной аутоиммунных заболеваний является разбалансировка иммунитета, в том числе сверхсинтез веществ, провоцирующих воспалительные реакции.

Одним из ключевых цитокинов иммунного воспалительного ответа является *фактор некроза опухолей* (TNF) – именно его повышенная продукция приводит к таким болезням аутоиммунной природы, как псориаз, болезнь Крона, ревматоидный артрит и т.п. Высокий уровень продукции TNF обуславливает и тяжелую патологию, часто завершающуюся летальным исходом – септический или эндотоксический шок.

Воспрепятствовать связыванию TNF с его белковыми рецепторами, зафиксированными на клеточных мембранах, можно с помощью соответствующих моноклональных антител либо так называемых растворимых форм его рецепторов, которые представляют собой внеклеточные домены (участки) рецепторных белков и обычно обнаруживаются в сыворотке и других биологических жидкостях. Присоединение подобных молекул к TNF должно инактивировать этот цитокин и уменьшить вызванный им воспалительный процесс.

Действительно, в модельных лабораторных экспериментах было доказано терапевтическое действие анти-TNF антител при лечении ряда патологий, обусловленных повышенной продукцией TNF. Однако попытки использовать для этих целей напрямую растворимые клеточные TNF-рецепторы не дали положительных результатов. Успеха удалось добиться лишь с помощью методов генетической инженерии, когда были созданы так называемые химерные белки, состоящие из TNF-связывающей части клеточных рецепторов и фрагмента иммуноглобулина человека.

Уже несколько таких биологических терапевтических средств, созданных на основе белков человеческого организма, в течение ряда лет успешно применяются в клинической практике для терапии воспалительных заболеваний неинфекционной природы. Это, в первую очередь, «Etanercept» (на основе химерного белка), а также «Infliximab» и «Adalimumab» (на основе моноклональных человеческих антител); недавно этот список пополнился еще двумя аналогичными препаратами.

Однако клинические исследования показали, что пациенты, страдающие ревматоидным артритом или другим воспалительным или аутоиммунным заболеванием, оказываются избирательно чувствительны лишь к одному из этих анти-TNF препаратов. Кроме того, поскольку все эти препараты имеют белковую природу, они сами по себе являются мишенью для иммунной системы больных, поэтому при длительной терапии их эффективность может снижаться. Это означает, что при потере чувствительности к одному препарату его требуется заменить на другой.

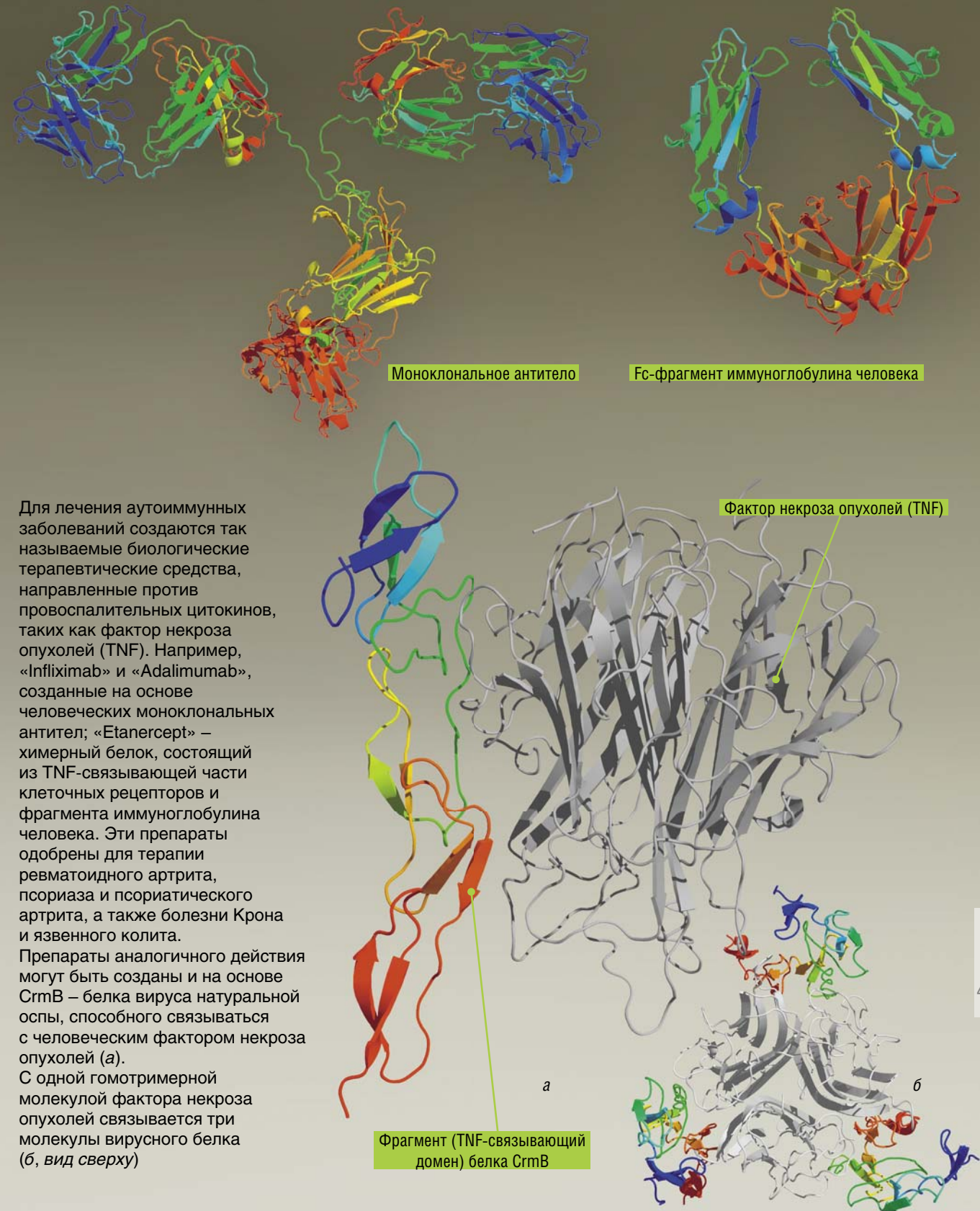
И вот здесь на помощь терапевтам могут придти новые лекарственные средства на основе вирусных белков. Например, в ГНЦ ВБ «Вектор» уже разрабатываются анти-TNF препараты на основе TNF-связывающих белков поксивирусов.

Методами генетической инженерии здесь были созданы рекомбинантные бакуловирусы, способные продуцировать в клеточной культуре TNF-связывающий белок (CrmB), характерный для вирусов оспы коров, оспы обезьян и натуральной оспы. Однако на экспериментальной модели эндотоксического шока было показано, что существенным терапевтическим эффектом обладает лишь белок CrmB вируса натуральной оспы (Gileva *et al.*, 2006). Именно этот белок или его реконструированные варианты могут стать действующим началом новых средств анти-TNF терапии (Гилева и др., 2009).

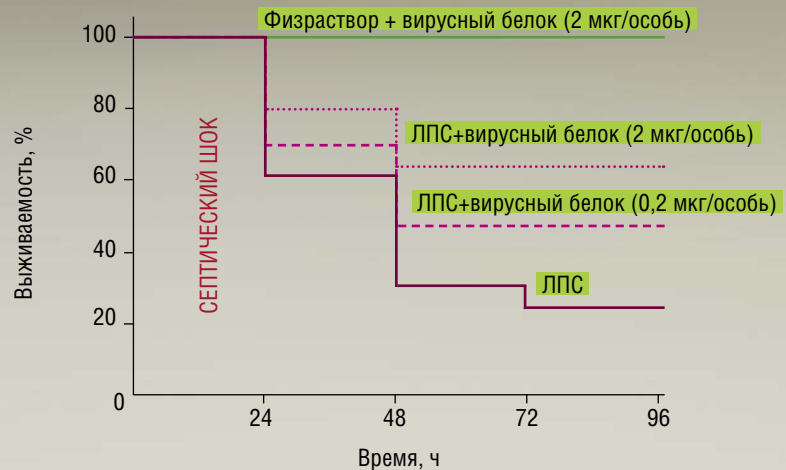
**РЕВМАТОИДНЫЙ АРТРИТ** — системное аутоиммунное заболевание соединительной ткани, проявляющееся главным образом хроническим воспалением суставов: голеностопных, лодыжек, коленей и кистей рук.

Сегодня от этой болезни страдает каждый сотый житель Земли, т.е. более 70 млн человек. Женщины болеют в несколько раз чаще, чем мужчины. Болезнь обычно развивается после 30 лет. В 70 % случаев ревматоидный артрит приводит к инвалидности, которая наступает довольно рано.

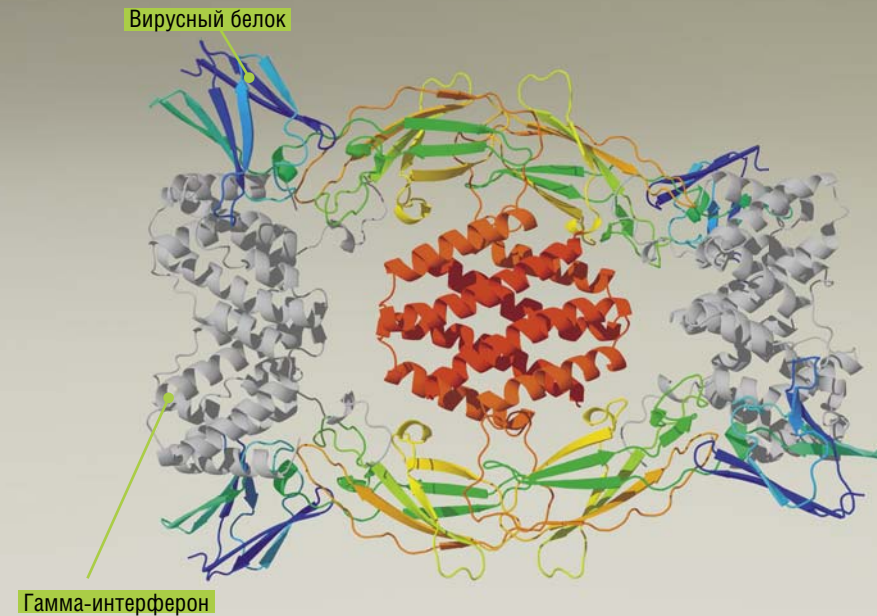
Причины возникновения этой болезни точно не установлены, но известно, что толчком к ее развитию служит сбой в иммунной системе в результате переохлаждения, стрессов, травм суставов и инфекции, в том числе ОРЗ, ангины и гриппа. При ревматоидном артрите наблюдается избыточный синтез таких провоспалительных цитокинов, как фактор некроза опухолей и гамма-интерферон



Для лечения аутоиммунных заболеваний создаются так называемые биологические терапевтические средства, направленные против провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухолей (TNF). Например, «Infliximab» и «Adalimumab», созданные на основе человеческих моноклональных антител; «Etanercept» — химерный белок, состоящий из TNF-связывающей части клеточных рецепторов и фрагмента иммуноглобулина человека. Эти препараты одобрены для терапии ревматоидного артрита, псориаза и псориатического артрита, а также болезни Крона и язвенного колита. Препараты аналогичного действия могут быть созданы и на основе CrmB — белка вируса натуральной оспы, способного связываться с человеческим фактором некроза опухолей (а). С одной гомотримерной молекулой фактора некроза опухолей связывается три молекулы вирусного белка (б, вид сверху)



Эффективность действия TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы при терапии септического шока проверена на лабораторных мышцах, которым был введен бактериальный липополисахарид (ЛПС) – компонент бактериальных стенок, вызывает сильный иммунный ответ с выделением провоспалительных цитокинов, что приводит к развитию опасного септического шока. Введение вирусного белка значительно повысило выживаемость заболевших особей



В ГНЦ ВБ «Вектор» получен рекомбинантный белок вируса натуральной оспы, способный связываться с человеческим гамма-интерфероном ( $\gamma$ -IFN), секреция которого увеличивается при ряде аутоиммунных заболеваний. Слева – структура гомотетрамерного комплекса вирусного  $\gamma$ -IFN-связывающего белка, связанного с двумя гомодимерами  $\gamma$ -IFN человека

**СЕПСИС** (от греч. «гниение») – тяжелое инфекционное заболевание человека, которое развивается как системная воспалительная реакция при попадании в кровь инфекционных агентов (бактерий или одноклеточных грибов) или их токсинов. Тяжесть заболевания нередко связана с развитием так называемого септического шока (инфекционно-токсический шок, эндотоксический шок), который чаще развивается при инфекции грамотрицательными бактериями и стафилококками и сопровождается нарушением функции легких, печени и почек, изменением свертывающей системы крови.

Несмотря на возросшие возможности современной антибактериальной и противогрибковой терапии, летальность при сепсисе до сих пор составляет 25–30%. На сегодняшний день эта болезнь остается одной из ведущих причин смертности: только в США от нее ежегодно умирает более 200 тыс. человек.

В настоящее время доказано, что инфекция сама по себе не является непосредственной причиной многочисленных патологических сдвигов, характерных для сепсиса. Скорее всего, они возникают как результат ответной реакции организма на инфекцию и некоторые другие факторы, обусловленной действием различных эндогенных регуляторных веществ. И если при нормальном состоянии подобные молекулярные реакции можно расценить как реакции приспособления или адаптации, то во время сепсиса их чрезмерная активация имеет повреждающий характер. Ведущую роль в качестве медиаторов повреждения при септическом шоке играют суперпродукцируемые фактор некроза опухолей, гамма-интерферон и ряд интерлейкинов

### «Золотое дно» фармацевтики

Возможности медицинского «приложения» вирусных белков далеко не исчерпываются одной лишь анти-TNF терапией. Так, еще одним воспалительным цитокином является широко известный *гамма-интерферон* ( $\gamma$ -IFN). И в настоящее время вторую стадию клинических испытаний уже проходит препарат «Fontolizumab», созданный на основе человеческих моноклональных анти-IFN $\gamma$  антител и предназначенный для лечения некоторых аутоиммунных заболеваний.

Однако эффективным ингибитором IFN $\gamma$  человека может оказаться и IFN $\gamma$ -связывающий белок, секретруемый вирусом натуральной оспы. Такой белок, полученный в ГНЦ ВБ «Вектор», эффективно ингибировал защитное действие человеческого гамма-интерферона при заражении культуры клеток легкого эмбриона человека вирусом энцефаломиокардита мышей. По этой характеристике вирусный белок значительно превосходил препарат на основе человеческих клеточных IFN $\gamma$ -рецепторов. (Непомнящих и др., 2005).

На сегодня имеется много данных о том, что воспалительный процесс и гистопатологические изменения при ряде воспалительных и аутоиммунных заболеваний нервной системы, артрите, гломерулонефрите, системной красной волчанке и других болезнях во многих случаях обусловлены активацией системы *комплемента крови*, представляющей собой еще одну из систем неспецифического иммунитета. Комплемент играет важную роль и в реакции отторжения трансплантата.

Поксвирусы кодируют особый белок (КСБ), способный ингибировать активацию комплемента, причем наиболее эффективно с белками комплемента чело-

века взаимодействует белок того же вируса натуральной оспы. Сегодня считается, что именно этот вирусный белок может стать перспективным препаратом для лечения болезни Альцгеймера, синдрома мультиорганной дисфункции и отторжения ксенотрансплантатов (Jha, Kotwal, 2003). Так, на лабораторных животных было показано, что рекомбинантный КСБ способствует восстановлению функций мозга после средней и тяжелой черепно-мозговой травмы. Этот белок оказался эффективен и при травмах спинного мозга: при его применении значительно уменьшались гистопатологические изменения, вызванные воспалительными реакциями.

В патогенезе воспалительных и аутоиммунных заболеваний важную роль играют и *хемокины* – обширное семейство небольших белков, имеющих очень сходную третичную структуру. Поксвирусы кодируют хемокинсвязывающие белки, по аминокислотной последовательности не имеющие гомологов среди известных белков позвоночных. Их высокий терапевтический потенциал был показан на ряде лабораторных моделей воспалительных и аутоиммунных заболеваний (Непомнящих, Щелкунов, 2008).

Таким образом, предположение ученых, что вирусные белки, являющиеся антагонистами иммунных белков-регуляторов, можно использовать в терапевтических целях, полностью подтвердилось. Сегодня на их основе с помощью методов генетической инженерии уже разрабатываются препараты нового поколения для коррекции патологических состояний человека, связанных с избыточной активацией белков-медиаторов защитных систем организма.

И с этой точки зрения, мы можем по-новому взглянуть на смертельно опасный для человека вирус натуральной оспы: результаты лабораторных исследований и доклинических испытаний свидетельствуют о большой перспективности препаратов для лечения тяжелейших воспалительных и аутоиммунных заболеваний человека, созданных на основе белков этого вируса, на протяжении столетий бывшего настоящим бичом цивилизаций.

Автор и редакция благодарят к.б.н. Д.В. Антонца (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор») за помощь в подготовке иллюстративного материала

*Литература*  
Непомнящих Т.С., Щелкунов С.Н. Иммуномодулирующие белки поксвирусов как новые средства иммунорекорректирующей терапии // Молекуляр. биология. 2008. Т. 42, № 5. С. 904–912.

Щелкунов С.Н. Вирус натуральной оспы – источник новых медицинских препаратов // Соросовский образовательный журнал. 1995. № 1. С. 28–31.

Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ. пособие. 3-е изд., испр. и доп. Новосибирск: Сиб. универ. изд-во, 2008. 514 с.

Щелкунов С.Н. Преодоление ортопоксвирусами защитных систем организма млекопитающих // Молекуляр. биология. 2011. Т. 45, № 1. С. 30–43.

Щелкунов С.Н. Оспа – дамоклов меч цивилизаций // Наука из первых рук. 2012. № 6 (48). С. 96–109.

Shchelkunov S.N. Orthopoxvirus genes that mediate disease virulence and host tropism // Advances in Virology. 2012. Vol. 2012, Article ID 524743, 17 p. doi:10.1155/2012/524743.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 12-04-00110а)