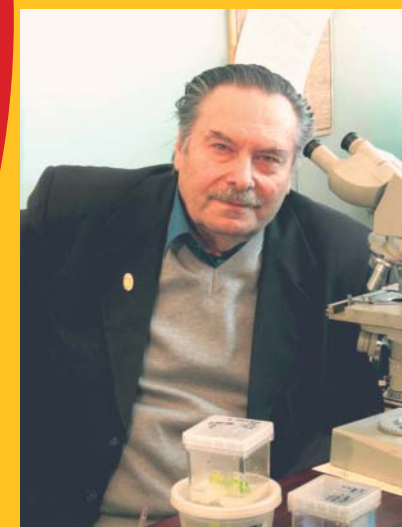


Вакцины завтрашнего ДНЯ

Пища необходима нам, как свет — растениям. Она дает нам энергию для умственных упражнений и физической активности, поставляет строительный материал мышцам, костям и нервам. Она может радовать наш вкус, осязание и обоняние, даже — наше чувство прекрасного. В XXI веке у пищи есть шанс обрести новые свойства: она сможет предохранять нас от болезней, перейдя из разряда «вкусной и питательной» в разряд «функциональной».
Знакомьтесь — съедобные вакцины!



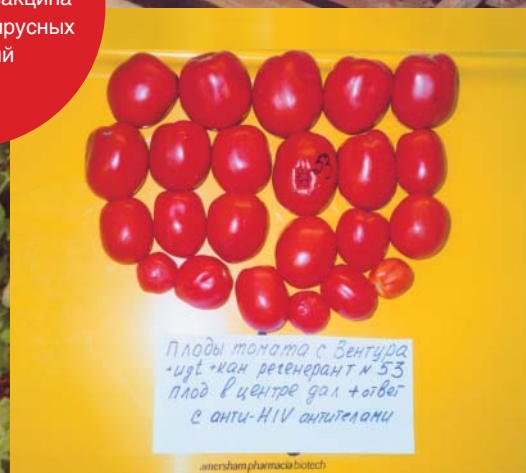
ЩЕЛКУНОВ Сергей Николаевич — доктор биологических наук, заведующий отделом молекулярной биологии геномов НИИ молекулярной биологии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (г. Новосибирск), профессор Новосибирского государственного университета



САЛЯЕВ Рюрик Константинович — член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, главный научный сотрудник Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск), советник РАН, заведующий кафедрой физиологии растений и клеточной биологии Иркутского государственного университета



Плоды этих трансгенных томатов — кандидатная вакцина против двух вирусных инфекций



Съел — и в порядке!

В чем же состоит уникальность и привлекательность такого типа вакцин — съедобных? Во-первых, сам способ иммунизации — оральный, т. е. через рот — является простым, удобным и безопасным, так как снижает риск заражения другими микроорганизмами по сравнению с инъекциями или скарификацией, нарушающими кожные покровы. Во-вторых, съеденная вакцина попадает напрямую в желудочно-кишечный тракт, а конкретно — к его слизистым оболочкам.

Слизистые (иначе *мукозные*, от англ. *mucosal*) оболочки пищеварительного, дыхательного и мочеполового трактов являются обычными местами проникновения и колонизации для многих патогенных микроорганизмов. Защита этих оболочек обеспечивается иммунокомпетентными клетками, организованными в специальные лимфоидные ткани. Эта так называемая *мукозная иммунная система* является первым барьером на пути инфекций в отличие от исторически первой изученной *системной иммунной системы*, обеспечивающей защиту внутренних органов организма.

Стимуляция гуморального иммунитета в результате инъекционной вакцинации обычно эффективно предотвращает системные инфекции, но при этом не защищает слизистые оболочки. Мукозная же иммунизация чаще приводит к стимуляции как мукозного, так и системного иммунных ответов.

Однако проводить иммунизацию через слизистые оболочки непросто из-за ряда физиологических барьеров, препятствующих проникновению антигенов. Оболочка же растительных клеток обеспечивает антигену естественную защиту при прохождении через пищевод и желудок с кислым пищеварительным соком. Затем «упакованный» антиген благополучно достигает кишечника и соответственно, — мукозной иммунной системы.

Привлекательным свойством растительных вакцин является не только их потенциальная дешевизна, простота хранения и применения, но и огромный спектр самих пищевых прототипов — овощей, фруктов, злаков. Более того, можно создать растения, продуцирующие одновременно антигены разных инфекционных агентов, т. е. съедобные многокомпонентные вакцины! Не такой ли — почти «идеальной» — представлялась вакцина будущего основоположникам вакцинологии более 200 лет назад?

Начинка для Сеньора Помидора

Саму идею создания трансгенных растительных вакцин высказал в 1992 году американец Х. Мейсон. Через три года исследователи предприняли успешную попытку получения вакцины против гепатита В на основе трансгенного табака, в котором синтезировался поверхностный антиген (HBsAg) вируса. Рекомбинантный белок, выделенный из табака, при инъекции мышам вызывал у них такой же специфичный иммунный ответ, как и при использовании стандартной трансгенной вакцины из дрожжей. Затем был создан трансгенный картофель, продуцирующий HBsAg, а в 1999 году были начаты эксперименты на добровольцах, давшие положительный результат.

В последнее время одним из самых важных и пер-

спективных направлений в создании съедобных вакцин считается использование растений, которые могут широко использоваться в пищу без термообработки.

Ученые из Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (научоград Кольцово, Новосибирская область) в сотрудничестве с сотрудниками Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск) и новосибирского Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН поставили перед собой задачу создать кандидатные съедобные

вакцины против вируса гепатита В человека и вируса иммунодефицита человека на основе трансгенных растений томата. Проект получил финансовую поддержку Министерства сельского хозяйства США (грант № 2176р Международного научно-технического центра).



Эта футуристическая конструкция — искусственный полиэпитопный белок-иммуноген против ВИЧ-1

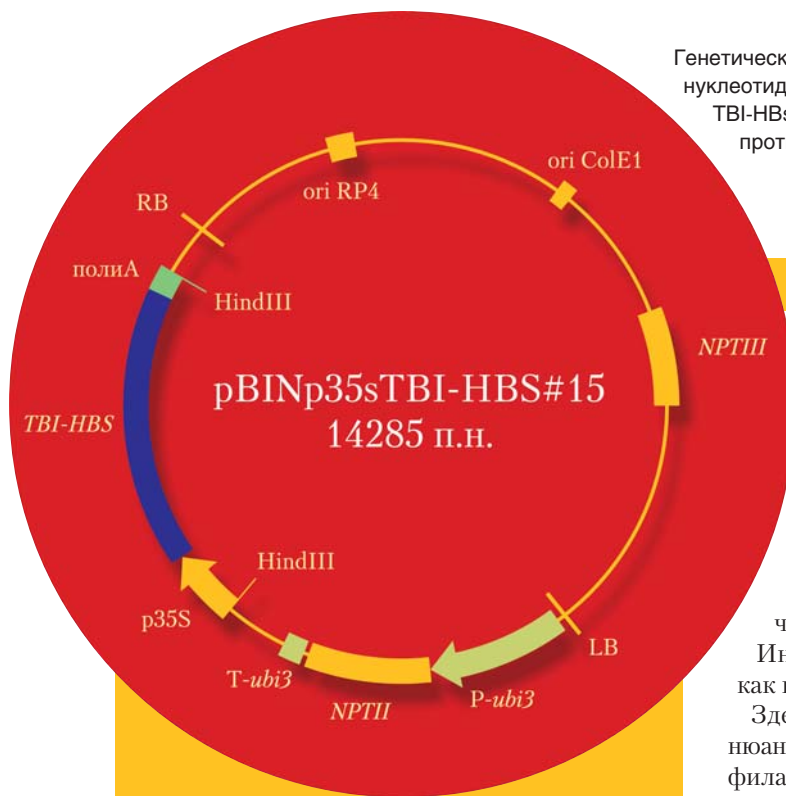
Вирусы иммунодефицита человека (ВИЧ) и гепатита В, к сожалению, хорошо известны и не нуждаются в «рекламе». Отметим только, что в современном мире распространение этих инфекций приобретает характер эпидемии. По данным ВОЗ смертность от СПИДа достигает 2–3 млн, а от гепатита В — 1 млн человек в год! Поэтому неудивительно, что эти болезни привлекают к себе пристальное внимание биотехнологов во всем мире.

Конструируем химеру

В создании генно-инженерных вакцин существует несколько подходов. При первом — в качестве встраиваемого фрагмента используется реальный ген инфекционного агента. Более нетрадиционным и многообещающим является конструирование генов, кодирующих искусственные белки, так называемые синтетические вакцины. Это — молекулы с заранее заданной третичной структурой и с оптимально подобранным составом *эпитопов*, т. е. «активных» центров инфекционного антигена, которые и запускают каскад иммунных реакций организма.

На основе этой методологии сотрудником ГНЦ ВБ «Вектор» А. М. Ерошкиным вместе с коллегами был рассчитан полиэпитопный белок-иммуноген против ВИЧ, названный *ТВИ* (T- and B-cellular immunogen). Затем для этого белка синтезировали кодирующую ДНК-последовательность и встроили ее в кишечную палочку *E. coli*. У животных, иммунизированных полученным рекомбинантным белком, был обнаружен как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ против вируса иммунодефицита, что доказало правильность используемого подхода.

Исследователи пошли дальше по пути создания именно съедобных вакцин. Было решено построить подобную генетическую конструкцию в растения томатов, в результате чего в них должен был синтезироваться «неприродный» белок. И не просто искусственный, но еще и химерный, поскольку к набору из девяти иммуногенных эпитопов белков ВИЧ-1 (ТВИ) был добавлен еще и поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). В результате ожидалось получить мультивалентную синтетическую вакцину одновременно против двух вирусных заболеваний. Генетические конструкции для переноса в растения были созданы сотрудниками «Вектора» и ИХБиФМ, а перенос их в растения томата и селективный отбор трансгенных растений осуществили сотрудники СИФИБРа.



Генетическая конструкция, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую TBI-HBs — полиэпитопный белок-иммуноген против ВИЧ-инфекции и гепатита В

Цена «золотых яблок»

В листьях и плодах полученных трансгенных растений томата действительно были обнаружены антигенные детерминанты TBI и HBsAg, что, безусловно, подтверждало синтез в них целевого химерного белка TBI-HBsAg. Чтобы избежать возможной ошибки, определение белка иммуноферментными методами проводилось независимо в СИФИБРе и «Векторе». Но вот вопрос — оправдают ли эти аппетитные помидорчики свое итальянское имя — «золотые яблоки»? Иначе — будут ли трансгенные плоды «работать» как вакцина?

Здесь следует обратить внимание на следующий нюанс. Вакцина — не лекарство, она является лишь профилактическим средством. Как проверить ее эффективность, особенно в случае тяжелейших, более того — смертельных заболеваний? В этом случае нам, пожалуй, не стоит следовать не слишком гуманному примеру гениального Дженнера, проверившего свое открытие на восьмилетнем ребенке. Нельзя ведь, в самом деле, накормив добровольцев (если таковые и нашлись бы) помидорами, затем заражать их ВИЧ-инфекцией и смотреть на результат?

Поэтому в «бой», как всегда, вступили лабораторные мыши. Правда, СПИДом, как, впрочем, и гепатитом, мыши не болеют, однако их иммунная система должна была отреагировать на интервенцию антигенного белка. Помидоры мыши тоже недолюбливают, поэтому массу из измельченных плодов сотрудники «Вектора» через катетер вводили животным прямо в пищевод. Для оценки же мышинного иммунитета использовался стандартный иммуноферментный анализ (ИФА) на наличие антител к вирусам гепатита В и ВИЧ-1.

Эксперимент, в котором мышей кормили помидорами три раза с интервалом в 2 недели, закончился совсем недавно — в сентябре этого года. И его можно однозначно назвать успешным: уже после второго кормления в крови иммунизированных животных значительно увеличился уровень антител против вируса гепатита В. Более того, мукозный иммунный ответ, судя по результатам анализа мышинных фекалий, начинался еще раньше — уже после первого кормления — и сохранялся до конца эксперимента. В отношении ВИЧ картина была схожей и, хотя уровни выявленных антител были не столь высоки, они достоверно отличались



Из более чем 2000 генетически трансформированных проростков томата было отобрано около двух десятков растений, у которых полимеразная цепная реакция (ПЦР) показала присутствие в их тканях гена TBI-HBs.

1–9 — ДНК из плодов индивидуальных трансгенных растений; К — ДНК из плода контрольного растения; A.t. — ДНК гена, клонируемого в плазмиде почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*

В листьях и плодах трансгенных томатов поколения T1 обнаружен конечный продукт экспрессии гена — химерный белок TBI-HBsAg. По уровню продукции белка наблюдалось клоновое разнообразие, что обусловлено положением трансгена в геноме растения.

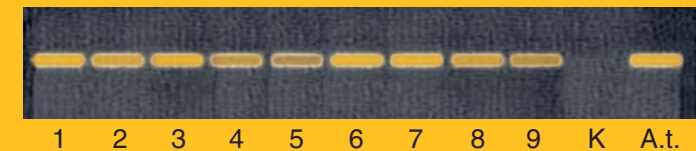
1–15 — плоды индивидуальных трансгенных растений; К — плод контрольного растения

от аналогичных анализов у контрольных животных, сидевших на «диете» из обычных нетрансгенных томатов.

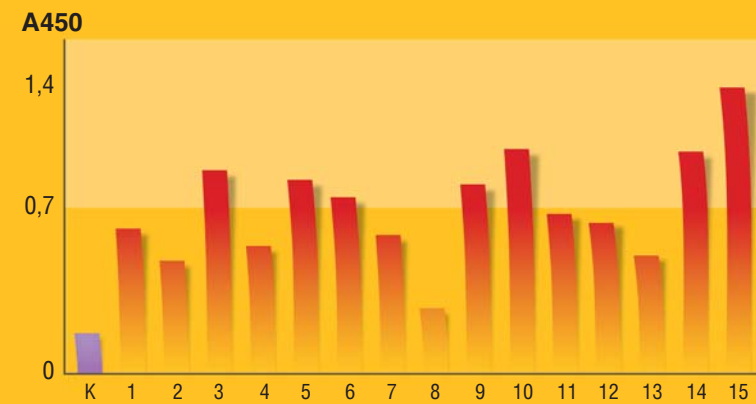
Таким образом, можно сказать, что кандидатная съедобная вакцина одновременно против двух вирусных инфекций — гепатита В и ВИЧ-инфекции (СПИДа) — в принципе получена. В этой фразе отметим два слова — *в принципе* и *кандидатная*, которые, как макушка айсберга, обозначают проблему.

Вообще-то, планов у участников проекта много: кроме томатов, хотелось бы использовать и другие привлекательные носители трансгенов, например, морковь, сладкий перец, злаки, объединяя свои усилия с учеными из других городов и институтов. А еще можно попробовать увеличить продуктивность растений-вакцин, трансформируя не только их ядерный геном, но и генетический материал многочисленных хлоропластов, в которых происходит фотосинтез. Судя по нашим предварительным результатам, перспективным может оказаться «комбинированный» путь, т. е. сочетание съедобной вакцины с инъекцией плазмидных ДНК-вакцин. Эффективность полученной вакцины оценивалась косвенным путем, — почему бы не перейти к прямым клиническим испытаниям — например, на приматах? Но в Сибири бананы не растут, а уж сколько стоят здесь обезьяны...

И так во всем, — когда речь заходит о каких-то масштабных проверках, доклинических и прочих, о выведении устойчивых трансгенных линий растений, на передний план выходит сакраментальный для нашей страны призыв: «Ищите деньги!». Пока будущее — в тумане. А для продолжения работ требуется не менее 200 тысяч долларов в год. Интересно было бы знать — покрывает ли такая сумма хотя бы суточные траты Центра исследования СПИДа, что под Вашингтоном?



742 пн



Эти крохотные стерильные проростки томатов подверглись генетической трансформации уколом иглы, содержащей агробактерию с гибридной плазмидой