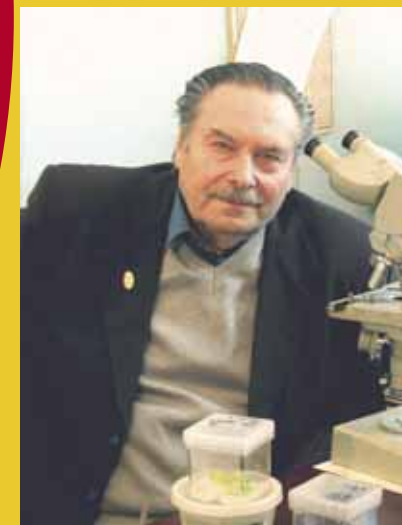


Вакцины завтрашнего ДНЯ

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!



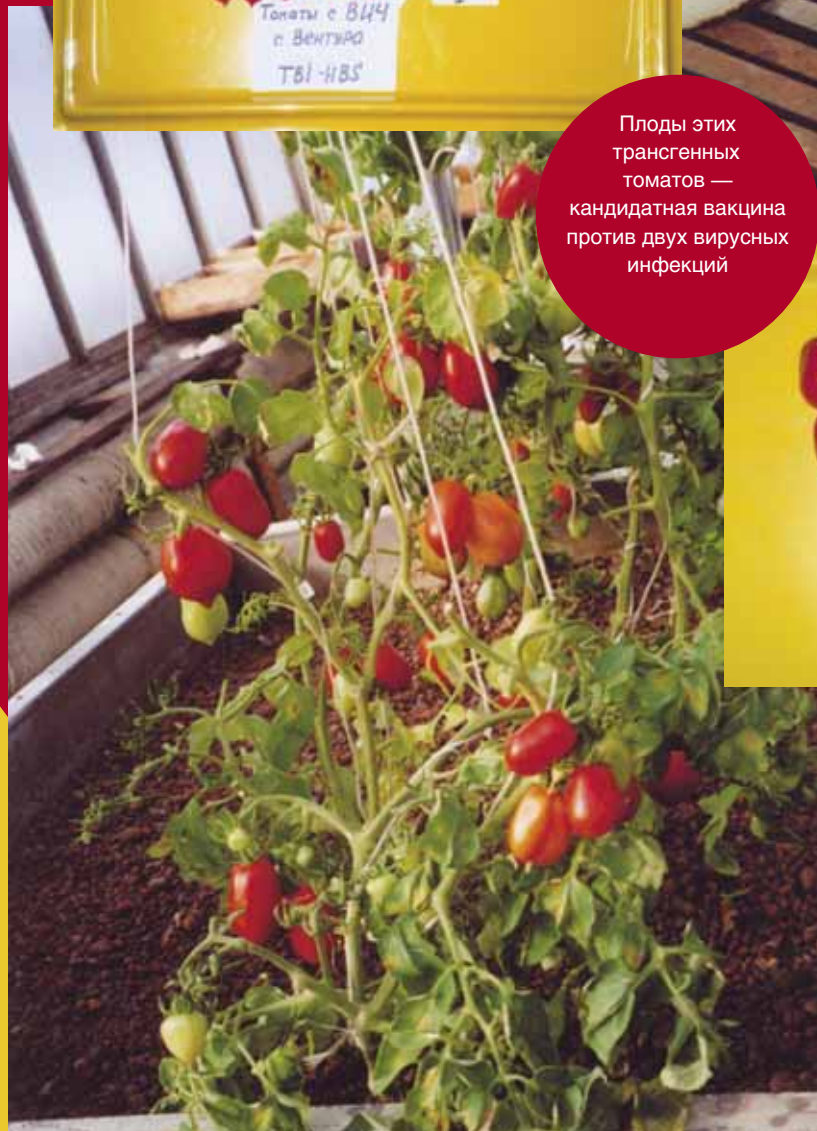
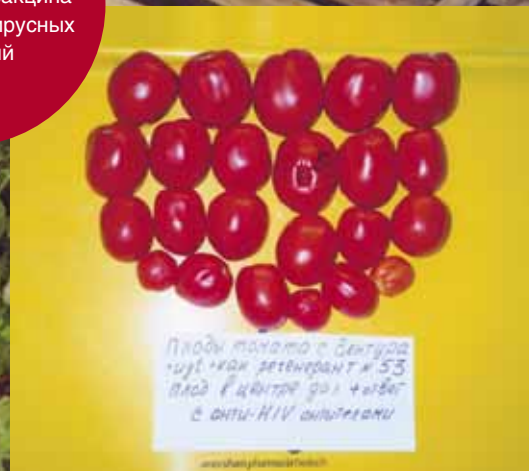
ЩЕЛКУНОВ Сергей Николаевич — доктор биологических наук, заведующий отделом молекулярной биологии геномов НИИ молекулярной биологии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (г. Новосибирск), профессор Новосибирского государственного университета



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



В мае 1796 года произошло событие «ценою» в миллионы спасенных человеческих жизней. Английский врач Эдуард Дженнер открыл способ предохранения от грозного заболевания — натуральной оспы — путем заражения легкой формой схожего заболевания, оспой коров. Эстафету Дженнера принял знаменитый французский ученый Луи Пастер — настоящий «микробный» Леонардо Да Винчи XIX века. С этого времени **вакцинация** (от лат. *vaccus* — корова) стала наиболее популярным, эффективным и доступным способом защиты населения от заболеваний, вызванных патологическими микроорганизмами, особенно — вирусами, фармацевтические препараты против которых практически отсутствуют.

Суть вакцинации заключается в том, что в организм вводятся убитые или ослабленные микробы, что обеспечивает развитие у человека **иммунитета**, т. е. невосприимчивости к болезни. Патогенные агенты «несут» на себе **антигены**, молекулы разной природы (белки, полисахариды и т. д.), которые распознаются организмом и вызывают защитный иммунный ответ. Первые вакцины получали методом проб и ошибок, но в наше время, благодаря развитию молекулярной биологии и генетической инженерии, открылись небывалые возможности для создания новых способов иммунизации и новых вакцин.

Среди них — ДНК-вакцины на основе генно-инженерных плазмид, микрокапсулированные и «леденцовые» вакцины с углеводом трегалозой, синтетические вакцины из искусственно синтезированных белков и полисахаридов... Требования к новым вакцинам едины: они должны быть безопасными, недорогими, простыми в использовании, длительно сохраняться и транспортироваться без использования холодильного оборудования. Все эти требования сполна удовлетворяют вакцины на основе генетически модифицированных растений со встроенными фрагментами ДНК патогенных микроорганизмов: их применение может стать революционным событием в профилактической медицине.

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 (НВsAg) 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 НВsAg, 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» (наукоград 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 вакци-

ны 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).

Вирусы иммунодефицита человека (ВИЧ) и гепатита В, к сожалению, хорошо известны и не нуждаются в «ре-

кламе». 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

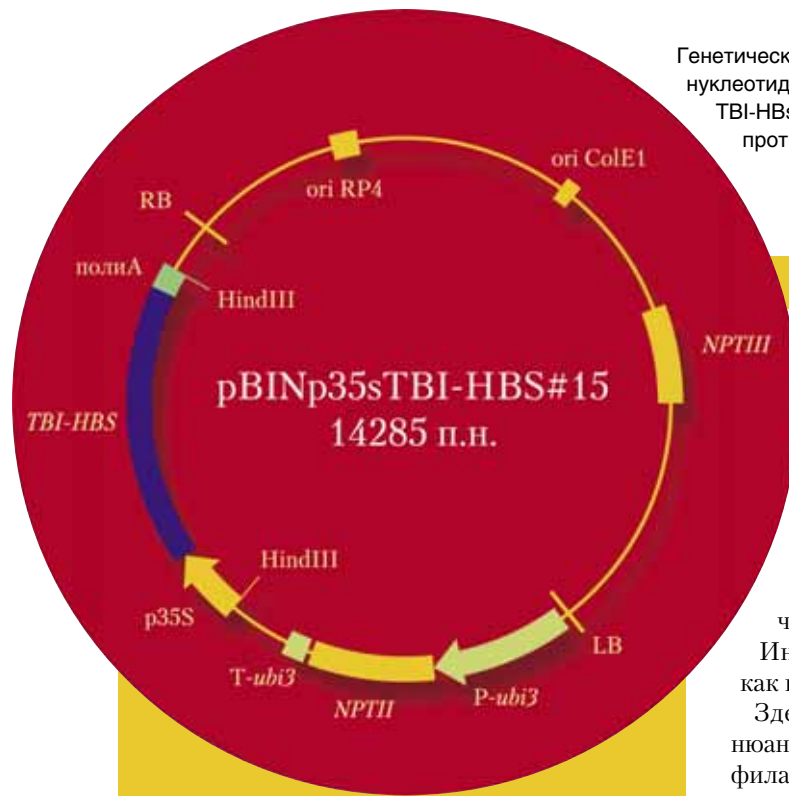
В создании генно-инженерных вакцин существует несколько подходов. При первом — в качестве встраиваемого фрагмента используется реальный ген инфекционного агента. Более нетрадиционным и многообещающим является конструирование генов, кодирующих искусственные белки, так называемые синтетические вакцины. 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* (Т- and В-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 встроить 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 (НВsAg). 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.



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



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 мышинового 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, начался 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 от анало-



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.

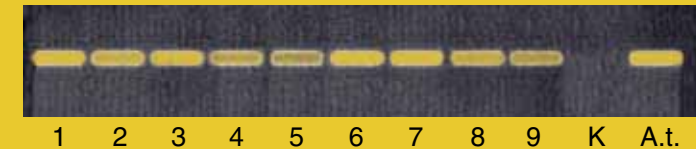
1–15 — плоды индивидуальных трансгенных растений; К — плод контрольного растения

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

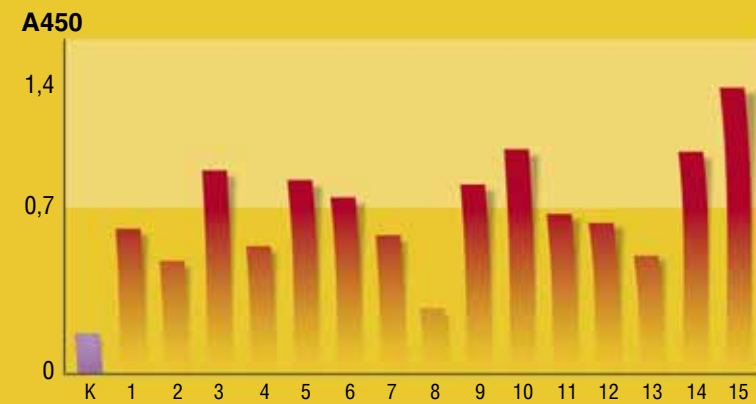
Таким образом, можно сказать, что кандидатная съедобная вакцина одновременно против двух вирусных инфекций — гепатита В и ВИЧ-инфекции (СПИДа) — в принципе получена. В этой фразе отметим два слова — *в принципе* и *кандидатная*, которые, как макушка айсберга, обозначают проблему.

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