

Экспериментальные живые аттенуированные вакцины против жёлтой лихорадки на основе инфекционных ДНК

P. Pushko¹, A. A. Ишмухаметов^{*1,2,3}, P. P. Bredenbeek⁴, I. S. Lukashevich⁵
DOI

¹ Medigen, Inc., Frederick, MD, USA

² ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН», Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова МЗ России, Россия

⁴ Department of Medical Microbiology, Center of Infectious Diseases, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

⁵ Department of Pharmacology and Toxicology, School of Medicine, Center for Predictive Medicine for Biodefense and Emerging Infectious Diseases, NIH Regional Biocontainment Laboratory, University of Louisville, USA

Резюме

Актуальность. Живые аттенуированные вакцины широко применяются в практике здравоохранения, благодаря приемлемому соотношению пользы и риска, а также высокой рентабельности. Однократная иммунизация в детском возрасте вакциной 17D против желтой лихорадки (ЖЛ) в эндемичном районе обеспечивает защиту от различных генотипов возбудителя данного заболевания на пятьдесят лет. Основным недостатком живых аттенуированных вакцин против РНК-вирусов является генетическая нестабильность способного к репликации вакцинного штамма. К недостаткам живых аттенуированных вакцин также можно отнести риск контаминации их другими возбудителями или реверсии к исходному вирусу дикого типа. Кроме того, затраты на поддержание холодовой цепи в тропических странах составляют почти 80% от стоимости вакцины. Поэтому актуальна разработка вакцин, сочетающих положительные характеристики живых аттенуированных вакцин и лишенных их недостатков.

Цель. Представить обзор результатов разработки технологии вакцины против желтой лихорадки на основе инфекционной ДНК, сочетающих преимущества вакцин на основе депротенизированной ДНК и живых аттенуированных вакцин.

Вывод. Если дальнейшие испытания пройдут успешно, то данный подход сможет кардинальным образом изменить процесс производства вакцин и иммунопрофилактику в целом

Ключевые слова: желтая лихорадка, вирус, вакцина, ДНК, инфекционная ДНК, иммунизация

Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Pushko P., Ишмухаметов А. А., Bredenbeek P. P. и др. Экспериментальные живые аттенуированные вакцины против жёлтой лихорадки на основе инфекционных ДНК. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2019; 18 (1): 18-25. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-1-18-25>.

Experimental DNA-Launched Live-Attenuated Vaccines Against Yellow Fever

P. Pushko¹, A.A. Ishmukhametov^{*2,3}, P.P. Bredenbeek⁴, I.S. Lukashevich⁵

¹ Medigen, Inc., Frederick, MD, USA

² Federal State Budget Institution of Science «Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences», Moscow, Russia

³ Sechenov First Moscow State Medical University, of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

⁴ Department of Medical Microbiology, Center of Infectious Diseases, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

⁵ Department of Pharmacology and Toxicology, School of Medicine, Center for Predictive Medicine for Biodefense and Emerging Infectious Diseases, NIH Regional Bio-containment Laboratory, University of Louisville, USA

* Для переписки: Ишмухаметов Айрат Айратович, генеральный директор Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН. Российская Федерация, 108819, город Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, тел. 8(495) 841-90-02, факс 8(495) 549-67-60, varicella@chumakovs.ru
©Ишмухаметов А. А. и др.

* Для переписки: Ишмухаметов Айрат Айратович, генеральный директор Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН. Российская Федерация, 108819, город Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, тел. 8(495) 841-90-02, факс 8(495) 549-67-60, varicella@chumakovs.ru
©Ишмухаметов А. А. и др.

Abstract

Background DNA-launched vaccine is “manufactured” in vaccinated individuals and does not require traditional vaccine manufacturing facility and technology.

Goals. Using yellow fever 17D vaccine, we have provided proof-of-concept evidence that these vaccine can be launched from DNA and induce specific immune responses against pathogenic virus causing yellow fever. The infectious DNA vaccine technology is based on the transcription of the full-length genomic RNA of the live-attenuated virus from plasmid DNA *in vitro* and *in vivo*. A few ng of infectious DNA encoding the fulllength genomic RNA are required to initiate the replication of the vaccine virus *in vitro*. The *in vivo*-generated viral RNA initiates limited replication of the vaccine virus, which in turn leads to efficient immunization. Electroporation *in vivo* has induced specific immune responses against pathogenic virus and protected mice against fatal disease. Here we describe a novel infectious DNA vaccine technology which combines advantages of naked DNA vaccination and live-attenuated vaccine efficacy.

Conclusions If successful in further testing, this technology can dramatically change the way we make vaccines as well as vaccination practice.

Key words: yellow fever, virus, vaccine, DNA, infectious DNA, immunization, electroporation

No conflict of interest to declare.

For citation: Pushko P., Ishmukhametov A. A., Bredenbeek P. P. et al. Experimental DNA-Launched Live-Attenuated Vaccines Against Yellow Fever. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2019; 18 (1): 18-25. (In Russ.).
<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-1-18-25>.

Введение

К одним из наиболее рентабельных и широко применяемых в практике здравоохранения иммунобиологических препаратов относят живые аттенуированные вакцины. Благодаря вакцинам этого типа удалось значительно снизить заболеваемость такими инфекциями, как эпидемический паротит, полиомиелит, корь и желтая лихорадка, возбудителями которых являются РНК-вирусы. В прошлом живые аттенуированные вакцины разрабатывались эмпирическим путем: при последовательных пассажах дикого вируса в культуре клеток его вирулентность уменьшалась, а иммуногенные свойства сохранялись. Живые ослабленные вакцины вызывают практически пожизненный иммунитет. Парадоксальность ситуации состоит в том, что современные требования к вакцинам столь строги, что, вероятно, ни одна из эффективных «старых» живых аттенуированных вакцин сегодня не могла бы быть утверждена к применению.

Совершенствование методов молекулярной вирусологии и алгоритмов рационального дизайна живых аттенуированных вакцин способствует созданию иммунобиологических препаратов нового поколения, которые могут быть одновременно и безопасными и эффективными [1]. Например, такие вакцины разработаны против гриппа (FluMist®, MedImmune, Inc), ротавирусной инфекции (Rotarix®, GSK Biologicals; RotaTeq®, Merck & Co., Inc., а также отечественных вакцин против кори, краснухи и паротита). Важно отметить, что эти вакцины разрешены к применению у детей младше двух лет, что свидетельствует о безопасности их применения даже в группе лиц с ослабленным иммунитетом.

Использование живых аттенуированных вакцин характеризуется приемлемым соотношением пользы и риска, а также высокой рентабельностью. Как было показано, однократная иммунизация в детском возрасте вакциной 17D против желтой лихорадки (ЖЛ) в эндемичном районе обеспечила

защиту от различных генотипов возбудителя данного заболевания на пятьдесят лет. В современных вакцинах на основе штамма YF17D (исходный штамм YF17D не применяют) используются три субштамма (17D-204, 17DD и 17D-213), различающихся несколькими нуклеотидами [2–4].

Основным недостатком живых аттенуированных вакцин против РНК-вирусов является генетическая нестабильность способного к репликации вакцинного штамма. В 1945 г. для обеспечения постоянства вакцинного штамма была предложена система посевных вирусов. Тем не менее, вариабельность штаммов в посевах сохраняется, что вызывает определенные трудности при производстве таких вакцин. Некоторые из них до сих пор производятся по технологии, почти не претерпевшей изменений за последние 50 лет. К недостаткам живых аттенуированных вакцин также можно отнести риск контаминации их другими возбудителями или реверсии к исходному вирусу дикого типа. Кроме того, затраты на поддержание холодовой цепи в тропических странах составляют почти 80% от стоимости вакцины.

Для решения многих из этих проблем и была создана технология производства ДНК-вакцин на основе инфекционной ДНК (идНК). Технология разработки вакцин на основе идНК® сочетает преимущества живых аттенуированных (ЖАВ) и традиционных ДНК-вакцин. Клонирование инфекционной РНК вакцинного штамма 17D вируса ЖЛ в бактериальной плазмиде проходит под контролем эукариотического промотора цитомегаловируса (CMV). После нескольких оптимизирующих процедур рекомбинантную плазмиду (идНК) вводят в вакцину, которая *in vivo* трансфицирует клетки-мишени. Полученная *in vivo* вирусная РНК запускает ограниченную репликацию вакцинного вируса, результатом чего становится эффективная иммунизация. Для производства вакцины на основе идНК не требуются традиционные производственные

предприятия и технологии, поскольку она вырабатывается непосредственно в вакцинированном организме. В таблице 1 представлены преимущества вакцин, полученных по технологии иДНК®, перед живыми аттенуированными и традиционными ДНК-вакцинами.

Такая вакцина в отличие от живых аттенуированных или традиционных инактивированных вакцин представляет собой рекомбинантную бактериальную плазмиду, экспрессирующую нужные гены (антигены) под контролем сильного эукариотического промотора. Результатом трансфекции ДНК становится низкий уровень экспрессии антигенов в соматических (кератиноциты, миоциты) и, вероятно, антигенпрезентирующих клетках (дендритные клетки, макрофаги). Кроме того, происходит презентация (в том числе перекрестная) антигенов посредством комплексов МНС I и II классов и стимуляция гуморальных и клеточных иммунных реакций. По-видимому, на адъювантный эффект ДНК-вакцин и их способность стимулировать реакции врожденного иммунитета влияют адъювантные свойства, присущие самой рекомбинантной бактериальной ДНК (например, активация TLR9 неметилованными участками CpG) [5, 6]. Производство иДНК-вакцин, которые не содержат примесей, относительно недорого и не занимает много времени, а их безопасность подтверждена многими клиническими исследованиями. Технология производства рекомбинантной ДНК позволяет разрабатывать ДНК-вакцины с необходимым набором генов, что обеспечивает их генетическую стабильность и безопасность. Причем для усиления иммуногенности алгоритмы рационального дизайна позволяют встроить в ДНК вакцинного штамма не только необходимый ген, но и гены, кодирующие цитокины и другие

молекулы, стимулирующие иммунные реакции. Следует также отметить, что ДНК-вакцины относительно устойчивы к температурным воздействиям, не требуют поддержания холодовой цепи и могут храниться долгое время на складе.

К сожалению, в настоящее время ни одна из разработанных ДНК-вакцин не получила официального разрешения для применения в медицинских целях, несмотря на то, что после открытия ДНК-иммунизации прошло 25 лет [7].

Основным недостатком ДНК-вакцин по-прежнему является их низкая иммуногенность при введении человеку, хотя для ее повышения и прилагаются огромные усилия с привлечением самых разных методов [5]. В то же время несколько ДНК-вакцин было одобрено для применения в ветеринарии: для профилактики инфекционного некроза гемопоэтической ткани у лососевых рыб (Aprex-INV, Novartis, Канада) [8] и защиты лошадей от вируса Западного Нила (West Nile-Innovator, CDC и Fort Dodge Labs, США). Еще две ДНК-вакцины недавно начали применять для генной терапии меланомы собак и для снижения перинатальной заболеваемости и смертности у свиней [6]. Многообещающие результаты применения таких вакцин в ветеринарии дают надежду на то, что в скором времени благодаря усовершенствованию технологии создания ДНК-вакцин трудности их применения у людей будут преодолены. Вероятно, профилактика данным типом вакцин будет проводиться по схеме «прайм-буст» (prime-boost), причем для ревакцинации будут использовать белок либо вектор. Благодаря тому, что недавно были одобрены профилактические вакцины Cervarix® и Gardasil® против рака шейки матки, вызываемого вирусами папилломы человека ВПЧ-16 и ВПЧ-18, а также вследствие появления передовых технологий, вновь возродился

Таблица 1.

Сравнительная характеристика ЖАВ, традиционных ДНК-вакцин и вакцин, полученных по технологии иДНК®

Table 1. Comparative characteristics of live attenuating vaccine (LAV), traditional DNA vaccines and vaccines obtained by the technology of iDNA®

Требования к вакцине Requirements to vaccine	ЖАВ LAV	ДНК-вакцины DNA vaccines	иДНК-вакцины iDNA® vaccine
Генетическая стабильность Genetic stability	Нет Not	Да Yes	Да Yes
Простота контроля производства Ease of production control	Нет Not	Да Yes	Да Yes
Соблюдение холодовой цепи Cold chain compliance	Да Yes	Нет Not	Нет Not
Однократное применение Single use	Да Yes	Нет Not	Да Yes
Минимум ядерных включений Minimum nuclear inclusions	Да Yes	Нет Not	Да Yes
Быстрый иммунный ответ Fast immune response	Да Yes	Нет Not	Да Yes
Эффективная защита Effective protection	Да Yes	Нет Not	Да Yes

интерес к использованию в целях формирования иммунного ответа рекомбинантной ДНК, кодирующей один или несколько специфических для опухоли антигенов. В настоящее время проводятся клинические испытания множества противоопухолевых вакцин на основе депротеинизированной ДНК [9, 10].

Идея использования рекомбинантной депротеинизированной ДНК для получения с помощью эукариотического промотора живой аттенуированной вакцины *in vivo* возникла при проведении экспериментов с полноразмерной κ ДНК, комплементарной геному штамма YF17D. В этих экспериментах штамм YF17D пытались использовать в качестве вектора для клонирования и экспрессии антигенов лихорадки Ласса, представляющей собой управляемую инфекцию, которой каждый год заболевают сотни тысяч жителей Западной Африки [11–14]. Ранее такой подход с частичным успехом уже применялся к возбудителям лихорадки Западного Нила и ящура [15–17]. Возможность производства живой аттенуированной вакцины в организме вакцинированных была изучена экспериментально на вакцине 17D против ЖЛ. В результате этих опытов была получена иДНК® и разработана технология ее изготовления [18–20].

Цель статьи – представить результаты исследований, доказывающих состоятельность технологии на основе инфекционной ДНК.

Несмотря на наличие высокоэффективной вакцины YF17D, за последние 30 лет число случаев заболевания желтой лихорадкой увеличилось. Причиной этого послужили следующие факторы: снижение популяционного иммунитета к вирусу ЖЛ, вырубка лесов, урбанизация, миграция населения, недостаточный контроль над переносчиками заболевания и изменение климата. До недавнего времени наблюдался дефицит данной вакцины, вследствие чего охват вакцинацией в районах с высоким риском заболевания остается недостаточным. Фактически, ЖЛ по-прежнему является возвращающейся инфекцией в тропических и субтропических областях Африки и остается серьезной угрозой для здоровья населения Южной Америки. По оценкам ВОЗ, ежегодно ЖЛ заболевают около 200 тыс. человек, из которых 30 тыс. больных погибают, причем в основном это жители Африки. Также причиной для беспокойства является возможность проникновения ЖЛ в страны Азии, где сейчас случаи инфекции не регистрируются [21–23]. Для удовлетворения возрастающих потребностей в вакцине против вируса ЖЛ в ближайшем будущем потребуются новые способы ее производства, транспортировки и хранения.

Инкубационный период при желтой лихорадке составляет 3–6 дней с момента укуса инфицированного комара. Клинические проявления могут быть самыми разными: от субклинических форм или неспецифического гриппоподобного заболевания до тяжелой болезни с фебрильной

лихорадкой, желтухой, печеночной и почечной недостаточностью, геморрагическим синдромом, шоком и летальным исходом. Классическое течение заболевания включает в себя три стадии. На первой стадии, длящейся 3–4 дня («период инфекции»), вирус определяется в крови. В случаях с летальным исходом вирусемия длилась дольше, чем у выживших, а при экспериментальном заражении мышей ее уровень составлял до 5–6 log LD₅₀/мл. Иногда за инфекционным периодом следует, часто неявный и очень короткий, период ремиссии, и при abortивном течении болезни на этой стадии пациент выздоравливает. Примерно у 15% пациентов отмечается «период интоксикации», и развивается тяжелое или среднетяжелое заболевание, характеризующееся желтухой. На 3–6 день после первых симптомов возвращается лихорадка, возникают брадикардия, тошнота, рвота, желтуха, олигурия и геморрагические проявления. Дальнейшее прогрессирование заболевания характеризуется полиорганной недостаточностью, в том числе поражением печени вследствие висцеротропности вируса, почек и сердечно-сосудистой системы. В тяжелых случаях летальность достигает 50%. С пятого по десятый день наблюдается критический период болезни, когда пациент выздоравливает или умирает [21].

Вирус ЖЛ, который относят к семейству Flaviviridae (род Flavivirus), представляет собой небольшой покрытый оболочкой вирус с одноцепочечным позитивным РНК-геномом длиной около 11 т.п.н. [23]. В геноме закодирована 5'-нетранслируемая область (5'-НТО), за которой следует открытая рамка считывания (ОРС) и 3'-НТО. ОРС кодирует полипротеин из 3411 аминокислот, который во время и после трансляции расщепляется на три структурных белка (С – белок капсида, рМ – премембранный белок и Е – белок оболочки) и семь неструктурных белков (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Белок NS5 кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp) флавивирусов. По данным экспериментальных исследований, RdRp штамма YF17D-204 характеризуется очень низкой по сравнению с другими РНК-вирусами частотой ошибок при репликации (1 замена на 2×10^7 нуклеотидов) [24].

На поздних стадиях репликации вируса ЖЛ структурные белки встраиваются в зрелые вирионные частицы; при этом неструктурные белки отвечают за репликацию и процессинг полипротеина. Белок С, взаимодействуя с РНК-геномом, формирует нуклеокапсид. Белок рМ является шапероном и отвечает за правильный фолдинг белка Е. Последний содержит детерминанты гемагглютинации и нейтрализации, взаимодействует с рецепторами клетки и запускает слияние мембран, что приводит к попаданию вирусной РНК в цитоплазму клетки-хозяина. Как показали генетические исследования, во многом именно белок Е определяет тропность вируса к определенным клеткам,

его вирулентность и иммуногенность [21, 23]. И хотя в гене белка Е было найдено несколько потенциально важных мутаций, очевидно, что вирулентность является полигенным фенотипическим свойством, определяемым генами как структурных, так и неструктурных белков [21].

Одной из самых безопасных и эффективных вакцин против ЖЛ является вакцина 17D. Она была получена эмпирическим путем в 30-е годы XX века учеными М. Тейлером и П. Смитом при проведении 176 последовательных пассажей прототипа штамма Asibi дикого типа вируса ЖЛ в различных тканях мышей и куриных эмбрионов, в том числе в измельченном курином эмбрионе без головного и спинного мозга. Полученный штамм YF17D утратил способность к репликации в клетках комара, нейро- и висцеротропные свойства, но сохранил высокую иммуногенность при попадании в организм человека. После однократной инъекции происходит выработка высокоаффинных нейтрализующих антител, что коррелирует с развитием иммунитета у 98% вакцинированных. В последнем меморандуме ВОЗ о вакцинах и вакцинации была пересмотрена необходимость ревакцинации через 10 лет по причине имеющихся сведений о том, что однократного введения вакцины достаточно для формирования стойкого пожизненного иммунитета [22,25,26].

За последние 75 лет более 600 млн человек во всем мире были успешно привиты вакциной на основе штамма YFV-17D, которая продемонстрировала высокую безопасность и эффективность [27]. В настоящее время ежегодно в целях иммунопрофилактики путешественников, военных и жителей эндемичных регионов используется около 30 млн доз данной вакцины. Нежелательные явления со стороны нервной системы или внутренних органов при применении вакцины YFV-17D редки (0,05–1,5 случаев на 100 тыс. вакцинированных), но летальность при этом высока [25]. По-видимому, данные осложнения возникают вследствие особенностей организма, а не самой вакцины.

Иммунизация вакциной на основе штамма YF17D является «золотым стандартом» иммунопрофилактики, однако ученым еще предстоит более подробно изучить механизмы ослабления вакцинного штамма и выявить нуклеотидные и аминокислотные последовательности, отвечающие за процесс аттенуации. В недавно проведенных исследованиях было показано, что в отличие от довольно однородной популяции штамма YF17D популяция штамма Asibi дикого типа включает в себя множество различных квазивидов [28, 29]. Из-за высокой частоты ошибок фермента RdRp квазивидовые популяции образуют множество РНК-вирусов, что, вероятно, влияет на их патогенный потенциал. Важно отметить, что в популяции вируса Asibi дикого типа аттенуирующие мутации найдены не были, что свидетельствует

о том, что штамм YF17D был получен вследствие отдельных мутаций, а не в результате геномной селекции в популяции вируса дикого типа.

За последние десятилетия технология производства вакцины на основе штамма YF17D практически не изменилась. Для ее получения до сих пор используются куриные эмбрионы, поэтому противопоказанием к вакцинации является аллергия на куриный белок. Кроме того, данная вакцина нуждается в усовершенствовании по причине вариативности вируса в каждой партии, риска контаминации материала микоплазмами или другими микроорганизмами, риска реверсии к генотипу дикого типа и необходимости поддержания холодной цепи.

Вакцина на основе иДНК, экспрессирующая штамм YF17D, сочетает в себе преимущества ДНК-вакцин и высокую эффективность живой ослабленной вакцины. Принцип ее создания заключается в присоединении 5'-НТО вирусной РНК к промотору CMV так, чтобы клеточная РНК-полимераза II инициировала транскрипцию генома вируса YF17D. Для получения правильного 3'-конца транскрибированной вирусной РНК рибозим вируса гепатита дельта (HDVr) был встроен за последним нуклеотидом генома вируса ЖЛ. На начальном этапе нуклеотидные последовательности промотора CMV и HDVr были клонированы и внедрены в плазмиду pACNR-FLYx [30]. Однако полученная в результате трансфекции в штамм DH5α *E. coli* оказалась генетически нестабильной. Попытки стабилизировать плазмиду с использованием различных штаммов бактерий и альтернативных условий культивирования успехом не увенчались. Это, предположительно, свидетельствует о том, что в кДНК вируса ЖЛ содержатся криптические бактериальные промоторы, посредством которых осуществляется синтез токсичных белков, влияющих на генетическую стабильность и выход рекомбинантной ДНК в *E. coli*. Чтобы уменьшить количество копий рекомбинантной плазмиды и стабилизировать ее, в качестве вектора для генной кассеты ДНК-экспрессируемой вакцины на основе штамма YF17D был использован вектор бактериальной искусственной хромосомы (BAC) – pBeloBAC11 [31]. Было показано, что полученная рекомбинантная бакмида pBeloBAC-FLYF оставалась генетически стабильной после не менее чем 20 пассажей в культуре клеток штаммов DH5α и DH10B *E. coli*.

После трансфекции клеток рекомбинантной бакмидой запускалась репликация инфекционного штамма YF17D.

Меченная 3[H]-уридином вирусная РНК (в присутствии актиномицина D) была впервые обнаружена через 27 часов после электропорации, и ее количество постепенно увеличивалось с течением времени, что может соответствовать распространению инфекции в изначально нетрансфицированных клетках. Показатель выхода штамма YF17D при транскрипции

иДНК составил около $8 \log_{10}$ БОЕ/мл, что сравнимо с показателем коммерческой вакцины YF17D-204.

Также с целью улучшения генетической стабильности и повышения выхода рекомбинантной плазмиды был применен второй подход, заключающийся во вставке интрона длиной 82 нуклеотида в положение 9152 полноразмерной иДНК штамма YF17D [32]. Сайт для вставки интрона был выбран путем прогнозирования положения бактериальных промоторов в пределах клонированной последовательности штамма YF17D. Было определено, что предполагаемые бактериальные промоторы были расположены между нуклеотидами 8617 и 9012. Интрон был встроен в положение 9152 и содержал пять стоп-кодонов для предотвращения трансляции последующих предполагаемых полипептидов в *E. coli*. Полученная в результате плазида YF17D-16 иДНК была стабильна в штамме Stb13 *E. coli* и использовалась для дальнейших исследований *in vivo* и *in vitro*. Трансфекции этой иДНК в количестве 10 нг было достаточно для запуска репликации вируса YF17D. По результатам ДСН-ПААГ-электрофореза и иммуноблоттинга была подтверждена продукция вирус-специфических структурных и неструктурных белков в клетках, трансфицированных иДНК. Оказалось, что бляшки, производимые полученными из иДНК вирусами, оказались более однородными по размеру по сравнению с бляшками, образованными вирусом коммерческой вакцины YF17D-204 [32].

В течение многих лет отсутствовала возможность использования мелких лабораторных животных в качестве модели, отражающей течение заболевания в организме человека. По этой причине проведение экспериментальных исследований молекулярных механизмов патогенеза ЖЛ и способов аттенуации ее возбудителя было ограничено. Однако недавно было показано, что в отличие от вируса живой аттенуированной вакцины 17D-204 вирулентность дикого штамма вируса ЖЛ зависела от наличия у мышей IFN- α/β [33]. На основании данного открытия был сделан вывод, что мыши линии A129, лишенные рецепторов IFN- α/β , инфицированные вирусом ЖЛ дикого типа, представляют собой подходящую модель для изучения висцеротропности данной инфекции, а также ее течения. Однако для экспериментов с вирусом ЖЛ дикого типа по-прежнему необходимо наличие лаборатории с 3 уровнем биологической безопасности. Между тем, дополнительные исследования показали, что при интраперитонеальном введении штамма YF17D мышам линии AG129, лишенных рецепторов IFN- $\alpha/\beta/\gamma$, степень проявления болезни зависела от дозы вводимого материала. У таких мышей были зарегистрированы высокие титры вируса в клетках мозга и печени, что позволяет предположить, что возбудитель инфекции характеризуется одновременно нейротропностью и висцеротропностью. На основании данных наблюдений мышей линии AG129, инфицированных вакцинным

штаммом YF17D, можно рассматривать как ценную модель, отражающую развитие заболевания в организме человека [34]. Примечательно, что для работы с данной моделью не требуется лаборатория с 3 уровнем биологической безопасности.

Было показано, что в ткани головного мозга мышей линии AG129 репликация вируса YF17D-204 и вируса, полученного при трансфицировании культуры клеток Vero иДНК плазмиды rYF17D-16, происходила сходным образом. Постепенное накопление вирусной РНК наблюдалось с 3 дня после инфицирования и достигало пика на 12–15 день. К этому времени у зараженных животных наблюдались симптомы нейротропных заболеваний (парезы, параличи верхних конечностей), и вскоре после этого мыши были подвергнуты эвтаназии. В тканях печени кинетика репликации вируса YF17D и вируса, полученного из иДНК плазмиды rYF17D-16, отличалась от таковой в ткани головного мозга. На ранней стадии инфекции определялась очень быстрая репликация обоих вирусов; при этом на 6 день был выявлен пик вирусной нагрузки, сопоставимый с 12–15 днем при репликации в ткани головного мозга. Несмотря на то, что кинетика репликации обоих ослабленных вирусов была сходной, репликация вируса YF17D-16 в печени была выражена меньше по сравнению с вирусом YF17D-204 [32].

Раннее начало репликации после иммунизации вакциной на основе штамма YF17D имеет решающее значение для формирования выраженного адаптивного иммунного ответа, который коррелирует с ранней выработкой IFN- γ [35,36]. И вирус YF17D и вирус из иДНК плазмиды rYF17D-16 быстро индуцировали экспрессию большого количества IFN- γ в селезенке мышей линии AG129, не показав существенных различий в уровне и времени индукции. Как и следовало ожидать, индукция мРНК IFN- γ в тканях печени была умеренной (здесь меньше чувствительных к индукции клеток), однако иммунный ответ у мышей, привитых вирусом YF17D-16, достиг своего пика раньше, чем у животных, которым был введен вирус YF17D [32].

Индукцию клеточного и гуморального иммунного ответа против вируса ЖЛ изучали при введении посредством электропорации бакмиды pBeloBAC-FLYF в организм трансгенных мышей линии AAD. Такие мыши экспрессируют домены $\alpha 1$ и $\alpha 2$ антигена HLA-A2.1 человека и домен $\alpha 3$ антигена H-2Db мыши, остальные гены соответствуют линии C57BL/6. Животным двукратно с интервалом в 14 дней внутримышечно вводили бакмиду pBeloBAC-FLYF-17D, не кодирующую эндотоксин, в дозе 10 нг, 100 нг или 1 мкг. Мышей впоследствии умерщвляли, а их селезенки использовали для определения методом ELISPOT (метод иммуноферментных зон или пятен) количества клеток, продуцирующих IFN- γ после воздействия пептидов вируса ЖЛ, которые представляют собой доминантные эпитопы CD8+ и CD4+-клеток, связанных с HLA-A2.

Было показано, что у мышей, вакцинированных бакмидой pBeloBAC-FLYF, формировался зависящий от дозы клеточный иммунный ответ против вируса ЖЛ. Наиболее выраженный иммунный ответ, опосредованный как CD8⁺-, так и CD4⁺-клетками, был получен после первичной иммунизации и ревакцинации бакмидой в дозе 1 мкг и более. По результатам внутриклеточного окрашивания цитокинов для выявления CD8⁺-клеток, специфических к вирусу ЖЛ и продуцирующих IL-2 или IFN- γ , была подтверждена зависимость иммунного ответа от дозы. Также было показано, что, хотя большинство CD8⁺-клеток после стимуляции специфическими пептидами вируса ЖЛ продуцировали IFN- γ , также были обнаружены полифункциональные CD8⁺-клетки.

Для формирования иммунитета после иммунизации вакциной на основе штамма YF17D достаточно выработки нейтрализующих антител в любом титре, который можно обнаружить. Кинетика продукции нейтрализующих антител после иммунизации 5 мкг бакмиды pBeloBAC-FLYF была изучена на мышах линии A129, лишенных рецепторов IFN- α/β . Несмотря на то, что вирус не был обнаружен в сыворотке этих мышей после прививки, у животных была выявлена продукция нейтрализующих антител против вируса ЖЛ. Показатель реакции нейтрализации по БОЕ50 (РНБОЕ50) на 11-й день после иммунизации достиг максимального значения: титры составили от 1:320 до 1:640. Согласно этим результатам у всех мышей линии BALB/c, которым посредством инъекции-электропорации была введена одна доза иДНК плазмиды rYF17D-16, в реакции РНБОЕ50 была обнаружена продукция специфических антител против вируса ЖЛ в аналогичных титрах [32].

Таким образом, для создания принципиально новой вакцины против вируса ЖЛ была применена технология иДНК α . Этот подход напоминает традиционную технологию получения «инфекционного клона», но не требует транскрипции РНК в лабораторных условиях и поэтому позволяет использовать иДНК для непосредственной вакцинации в условиях *in vivo*. Результатом успешного получения *in vivo* вакцины на основе штамма YF17D стала индукция вирус-специфического клеточного иммунитета и образование нейтрализующих антител у экспериментальных животных. Чтобы лучше оценить потенциальные возможности применения данной технологии (иммуногенность ДНК-экспрессируемой вакцины YF17D, эффективность и профиль безопасности), необходимо провести тщательные исследования на приматах. В отличие от обычных ДНК-вакцин для репликации вакцинного штамма YF17D и формирования иммунитета, по-видимому, достаточно наногаммов иДНК. Производимая в настоящее время вакцина на основе штамма YF17D содержит $5 \times 10^3 - 2 \times 10^5$ БОЕ в одной дозе. В наиболее успешных случаях у людей вскоре после вакцинации может выявляться низкий

уровень виремии (< 100 БОЕ/мл). Однако вакцины, не вызывающие виремию, также способны повышать уровень защитных нейтрализующих антител. Это означает, что даже при различной эффективности трансфицирования в условиях *in vivo* иммунизация иДНК может обеспечить защиту при условии транскрипции способного к репликации штамма YF17D. Тем не менее, для достижения большей иммуногенности и лучшей переносимости вакцины такого типа еще предстоит определить подходящую дозу иДНК, ее состав и подобрать оптимальные пути ее введения. Доставка ДНК-вакцин методом электропорации была широко изучена на многих животных, а в клинических испытаниях на человеке при применении такого метода были получены многообещающие результаты. Однако в последнее время больше внимания начали уделять внутрикожной иммунизации в связи с доступностью и обилием антиген-представляющих клеток в эпидермисе и дерме. При условии дальнейшего совершенствования состава ДНК и путей введения вакцины на основе иДНК штамма YF17D эти препараты могут стать альтернативой применяемым в настоящее время аттенуированным вакцинам, отличаясь стабильностью, простотой производства и контроля качества. Кроме того, принцип создания рекомбинантной иДНК вируса YF17D в перспективе может быть использован для разработки иммунобиологических препаратов против других вирусов.

Заключение

Цель разработки технологии иДНК α – объединить положительные свойства живых аттенуированных вакцин и вакцин на основе плазмидной ДНК. Многие эффективные живые аттенуированные вакцины против РНК-вирусов обладают значительными преимуществами перед инактивированными и субъединичными вакцинами или вирусоподобными частицами, поскольку обеспечивают быстрое формирование стойкого гуморального и клеточного иммунитета после однократного введения при приемлемом соотношении риска и пользы. Однако ввиду строгости современных требований к безопасности для получения живых аттенуированных вакцин необходимо использовать новые подходы. Иммунизация с помощью иДНК позволяет избавиться от ряда таких существенных недостатков живых аттенуированных вакцин, как генетическая нестабильность и термолабильность. В случае успешного применения технологии иДНК α необходимость в традиционном процессе производства вакцин с использованием куриных эмбрионов и культур клеток полностью исчезнет, поскольку живая аттенуированная вакцина на основе иДНК будет «производиться» в организме вакцинированных лиц. Вакцины на основе иДНК не будут нуждаться в поддержании холодовой цепи и могут вводиться безыгольным способом. Результатом

использования технологии иДНК в сочетании с продуманной аттенуацией и усовершенствованной ДНК-иммунизацией может стать получение нового поколения более безопасных живых аттенуированных вакцин с более широким спектром

применения. Безусловно, перед тем как проводить испытания иДНК вакцин на людях необходимо изучить возможности ее использования на более сложных моделях животных, в том числе приматах.

Литература/References

1. Lauring AS, Jones JO, Andriano R. Rationalizing the development of live attenuated vaccines. *Nature Biotechnology*. 2010;28(5):573–579.
2. Rice CM, Lencches EM, Eddy SR, et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*. 1985;229(4715):726–733.
3. Hahn C, Dalrymple JM, Strauss JH, et al. Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(7):2019–2023.
4. dos Santos C, Post PR, Carvalho R, et al. Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. *Virus Res*. 1995;35(1):35–41.
5. Li L, Saade F, Petrovsky N. The future of human DNA vaccines. *J Biotechnol*. 2012;162(2-3):171–182.
6. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready to prime? *Nat Rev Genet*. 2008;9(10):776–788.
7. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. 1990;247(4949):1465–1468.
8. Alonso M, Leong JAC. Licensed DNA vaccines against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Recent Pat DNA Gene Seq*. 2013;7(1):62–65.
9. Senovilla L, Vaccelli E, Garcia P, et al. Trial watch: DNA vaccines for cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2013;2(4):e23803.
10. Pol J, Bloy N, Obrist F, et al. Trial watch DNA vaccines for cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2014;3(4):e28185.
11. Bredenbeek P, Molenkamp R, Spaan W, et al. A recombinant yellow fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology*. 2006;345(2):299–304.
12. Jiang X, Dalebout T, Pushko P, et al. Towards a DNA based recombinant Yellow fever/Lassa vaccine [abstract]. In: The 28th ASV meeting, Vancouver, BC. 2009;W49-1:21.2
13. Jiang X, Dalebout TJ, Bredenbeek PJ, et al. Yellow fever 17D-vectored vaccines expressing Lassa virus GP1 and GP2 glycoproteins provide protection against fatal disease in guinea pigs. *Vaccine*. 2011;29(6):1248–1257.
14. Carrion RJ, Bredenbeek P, Jiang X, et al. Vaccine platforms to control arenaviral hemorrhagic fevers. *J Vaccines Vaccination*. 2012;3(7):160.
15. Gordon W, Rieder E, Mason PW. Plasmid DNA encoding replicating foot-and-mouth disease virus genomes induces antiviral immune responses in swine. *J Virol*. 1997;71:7442–7447.
16. Hall RA, Nisbet DJ, Pham KB, et al. DNA vaccine coding for the full-length infectious Kunjin virus RNA protects mice against the New York strain of West Nile virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(18):10460–10464.
17. Yamschikov V, inventor; University of Kansas assignee. Infectious DNA as a vaccine against west nile and other flaviviruses. United States patent US 7459163B2. 2008 Dec 2.
18. Tretyakova I, Lukashevich IS, Glass P, et al. Novel vaccine against Venezuelan equine encephalitis combines advantages of DNA immunization and a live attenuated vaccine. *Vaccine*. 2013;31(7):1019–1025.
19. Tretyakova I, Hearn J, Wang E, et al. DNA vaccine initiates replication of live attenuated chikungunya virus in vitro and elicits protective immune response in mice. *J Infect Dis*. 2014;209(12):1882–1890.
20. Pushko P, Lukashevich I, inventors; Medigen, inc. assignee. IDNA vaccines and methods for using the same. United States patent US 8691563. 2014 April 8.
21. Monath TP. Yellow fever vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. *Vaccines*. 4th ed. PA: Saunders, Philadelphia; 2004. P. 1095–1176.
22. Monath T. Yellow fever vaccine. *Expert Rev. Vaccines*. 2005;4(4):553–574.
23. Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins; 2001. P. 991–1042.
24. Pugachev KV, Guirakhoo F, Ocran SW, et al. High fidelity of yellow fever virus RNA polymerase. *J Virol*. 2004;78(2):1032–1038.
25. Monath T. Review of the risks and benefits of yellow fever vaccination including some new analyses. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(4):427–448.
26. WHO. Vaccines and vaccination against yellow fever. WHO Position Paper, June 2013-Recommendations. *Vaccine*. 2014. P. S0264-410X(14)00707-5.
27. Querec T, Bennouna S, Alkan S, et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med*. 2006;203(2):413–424.
28. Beck A, Tesh RB, Wood TG, et al. Comparison of the live attenuated yellow fever vaccine 17D-204 strain to its virulent parental strain Asibi by deep sequencing. *J Infect Dis*. 2014;209(3):334–344.
29. Tangy F, Despre's P. Yellow fever vaccine attenuation revealed: loss of diversity. *J Infect Dis*. 2014;209(3):318–320.
30. Bredenbeek P, Kozi EA, Lindenbach B, et al. A stable fulllength yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J Gen Virol*. 2003;84:1261–8.
31. She K. So you want to work with giants: the BAC vector. *BioTeach J*. 2003;1:69–74.
32. Tretyakova I, Nickols B, Hidajat R, et al. Plasmid DNA Initiates replication of yellow fever vaccine in vitro and elicits virus-specific immune response in mice. *Virology*. 2014;468:28–35.
33. Meier K, Gardner CL, Khoretchenko MV, et al. A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. *PLoS Pathog*. 2009;5(10):e1000614.
34. Thibodeaux B, Garbino NC, Liss NM, et al. A small animal peripheral challenge model of yellow fever using interferon-receptor deficient mice and the 17D-204 vaccine strain. *Vaccine*. 2012;30(21):3180–3187.
35. Neves P, Matos DC, Marcovisz R, et al. TLR expression and NK cell activation after human yellow fever vaccination. *Vaccine*. 2009;27(41):5543–5549.
36. Neves P, Santos JR, Tubarao LN, et al. Early IFN-gamma production after YF 17D vaccine virus immunization in mice and its association with adaptive immune responses. *PLoS One*. 2013;8(12).

Об авторах

- **Петер Пушко** – Отдел вирусологии, Медицинский научно-исследовательский институт инфекционных болезней армии США, Форт Детрик, Фредерик, MD 21702, США. peter.pushko@amedd.army.mil
- **Айрат Айратович Ишмухаметов** – д.м.н., профессор, член корреспондент РАН, генеральный директор Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН, Российская Федерация, заведующий кафедрой Организации и технологии производства иммунобиологических препаратов Семеновского университета. 108819, город Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, тел. 8(495) 841–90–02. +7 (495) 549–67–60, varicella@chumakovs.ru
- **Петер Дж. Бреденбек** – доцент кафедры медицинской микробиологии Утрехтского государственного университета, Ялелан 1, 3508 ТД Утрехт, Главный корпус, Альбинус Драйв 2, 2333 ЗА Лейден, Номер комнаты L4-54. +31 71 526 1655. p.j.bredenbeek@lumc.nl
- **Игорь Сергеевич Лукашевич** – д.м.н., профессор Кафедры фармакологии и токсикологии медицинского факультета Луисвиллского университета Медицинский университет. Ул. East Chestnut 323, Университет Луисвилля, Луисвилл, Кентукки 40202. igor.lukashevich@louisville.edu

Поступила: 12.11.2018 Принята к печати: 24.01.2019

About the Authors

- **Peter Pushko** – Virology Division, United States Army Medical Research Institute for Infectious Diseases, Fort Detrick, Frederick, Maryland 21702, USA. peter.pushko@amedd.army.mil
- **Peter J. Bredenbeek** – Assistant Professor of Department of Medical Microbiology, State University of Utrecht, Yalelaan 1, 3508 TD Utrecht, The Netherlands Faculteit Geneeskunde, LUMC Main Building, Albinusdreef 2. 2333 ZA Leiden, Room number L4-54. +31 71 526 1655. p.j.bredenbeek@lumc.nl
- **Ayrat A. Ishmukhametov** – doctor of medical sciences, professor, member of the Russian Academy of Sciences, general director of the Federal Research Center for Research and Development immunobiological preparations to them. MP Chumakov of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of the Organization and Production Technology of Immunobiological Preparations of the Sechenov University. 108819, Moscow, Moskovsky settlement, village of the Institute of Poliomyelitis, household 8, building 1, tel. 8 (495) 841–90–02. +7 (495) 549–67–60, varicella@chumakovs.ru
- **Igor S. Lukashevich** – Dr. Sci. (Med.), Department of Pharmacology and Toxicology, Louisville, Kentucky, United States of America 323 East Chestnut St., University of Louisville, Louisville, KY 40202. igor.lukashevich@louisville.edu

Received: 12.11.2018 Accepted: 24.01.2019