

© П.Ю.ПОПОВА, Н.И.МИКШИС, 2016

П.Ю.Попова, Н.И.Микшис

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ЖИВЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ СИБИРЕЯЗВЕННЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ И НЕПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Живые генно-инженерные сибиреязвенные вакцины на платформе авирулентных и пробиотических микроорганизмов являются безопасной и адекватной альтернативой препаратам на основе аттенуированных штаммов *Bacillus anthracis*. Мукозальная аппликация приводит к непосредственному контакту вакцинных препаратов со слизистыми оболочками в тех органах и тканях макроорганизма, которые в первую очередь подвергаются воздействию патогена, приводя к развитию местного и системного иммунного ответа. Живые рекомбинантные сибиреязвенные вакцины могут применяться как самостоятельно, так и в схеме прайм-бустерной иммунизации. В обзоре сделан акцент на иммуногенных и протективных свойствах экспериментальных живых генно-инженерных препаратов, созданных на основе представителей родов *Salmonella*, *Lactobacillus* и аденовирусов.

Журн. микробиол., 2016, № 1, С. 79—89

Ключевые слова: сибиреязвенные вакцины, иммунизация, мукозальный иммунитет, сальмонеллы, лактобациллы, аденовирусы

P.Yu.Popova, N.I.Mikshis

PERSPECTIVES OF DEVELOPMENT OF LIVE RECOMBINANT ANTHRAX VACCINES BASED ON OPPORTUNISTIC AND APATHOGENIC MICROORGANISMS

Russian Research Institute for Plague Control «Microbe», Saratov, Russia

Live genetic engineering anthrax vaccines on the platform of avirulent and probiotic microorganisms are a safe and adequate alternative to preparations based on attenuated *Bacillus anthracis* strains. Mucosal application results in a direct contact of the vaccine preparations with mucous membranes in those organs and tissues of the macro-organisms, that are exposed to the pathogen in the first place, resulting in a development of local and systemic immune response. Live recombinant anthrax vaccines could be used both separately as well as in a prime-boost immunization scheme. The review focuses on immunogenic and protective properties of experimental live genetic engineering preparations, created based on members of geni of *Salmonella*, *Lactobacillus* and adenoviruses.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 1, P. 79—89

Key words: anthrax vaccines, immunization, mucosal immunity, *Salmonella*, *Lactobacillus*, adenoviruses

Острое особо опасное инфекционное заболевание — сибирская язва является угрозой санитарно-эпидемиологическому благополучию населения, что обусловлено комплексом факторов. Среди них важную роль играют наличие множества стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов, способность возбудителя к образованию чрезвычайно устойчивых спор, высокая летальность при аэрозольном заражении.

Центральная роль в патогенезе сибиреязвенной инфекции отведена бинарному экзотоксину. Экзотоксин состоит из трех белков, детерминанты синтеза которых расположены на плазмиде рХО1. Протективный антиген (ПА), неток-

сичная субъединица, ответственен за связывание с клеточными рецепторами и транслокацию токсичных субъединиц — отечного (ОФ) и летального (ЛФ) факторов в клетку. Белковая молекула ПА включает четыре функциональных домена. Домен 1 (249 аминокислотных остатков) содержит сайт протеолитической активации. Под действием клеточной протеазы фурина *in vivo* или трипсина *in vitro* молекула ПА расщепляется на фрагменты ПА20 и ПА63 с молекулярной массой 20 кДа и 63 кДа, соответственно. Аминокислотные остатки с 250 по 487 представляют домен 2, содержащий сайт расщепления хемотрипсином, необходимый для реализации токсичных свойств *Bacillus anthracis*. Наименьшим числом аминокислотных остатков, с 488 по 594, представлен домен 3. Он включает в себя гидрофобную часть, участвующую во взаимодействиях с ОФ и ЛФ. Последовательности с 595 по 735 составляют домен 4. Эта часть молекулы ПА отвечает за закрепление токсина на специфическом рецепторе клетки-мишени [2, 8, 39].

ПА обладает выраженным защитным потенциалом и является базисом для создания эффективных сибиреязвенных вакцин. При этом возможно включение в генетическую конструкцию детерминант синтеза как полноразмерной молекулы ПА, так и его отдельных доменов, например, домены 1 и 4.

В России для профилактики сибирской язвы лицензирована живая вакцина на основе токсигенного бескапсульного штамма *B. anthracis* СТИ-1. В США и Великобритании лицензированы химические вакцины, представляющие собой адсорбированный на солях алюминия ПА, выделенный из аттенуированного бескапсульного штамма возбудителя сибирской язвы [6, 7, 20, 21]. Несмотря на доказанную многолетними исследованиями эффективность, указанные препараты не лишены ряда недостатков. В настоящее время усилия ученых направлены на создание усовершенствованной сибиреязвенной вакцины, которая должна сочетать в себе высокую иммуногенность и безопасность. Подобным требованиям в полной мере отвечают химические вакцины на основе рекомбинантных высокоочищенных протективных антигенов сибиреязвенного микроба. Работы по созданию рекомбинантных вакцин активно ведутся в крупнейших институтах мира. Нами был разработан иммуногенный, протективный и безопасный прототип химической вакцины на основе рекомбинантного ПА (рПА) [1]. В последнее время широко обсуждается парадигма прайм-бустерной схемы иммунизации, включающей первичное введение живой вакцины и бустерную иммунизацию химической вакциной.

Создание живых вакцин нового поколения также подразумевает использование рекомбинантных технологий, позволяющих создавать штаммы с заданными свойствами. Перспективными экспериментальными разработками являются живые вакцины с клонированными детерминантами иммуногенности, кодирующими синтез ПА, на основе аттенуированных штаммов *B. anthracis*, штаммов гетерологичных видов бактерий, вирусов.

В течение последнего десятилетия активно ведутся разработки по созданию живых вакцин на платформе условно патогенных и непатогенных бактерий, таких как представители родов *Salmonella* и *Lactobacillus*. Преимуществом подобных вакцин является пероральный или интраназальный способ их введения. Неинвазивность указанных способов позволяет снизить затраты на проведение вакцинации, в случае необходимости препараты могут применяться самостоятельно. Важно, что при мукозальной аппликации вакцинный препарат контактирует непосредственно со слизистыми оболочками в тех органах и тканях организма человека, которые в первую очередь подвергаются воздействию патогена. Активируются как местный, мукозальный, так и системный иммунный ответ, как гуморальные, так и клеточные механизмы защиты [4, 23, 41, 51].

Штамм *S. enterica* serovar Typhi Ty21a лицензирован для применения у людей, что позволяет использовать его как реципиента при конструировании живых про-

филактических препаратов для иммунизации людей. Длительное наблюдение (25 лет) не выявило случаев реверсии штамма к вирулентному фенотипу и фактов развития серьезных побочных реакций у привитых людей [15, 53]. Разработаны термостабильные формы, позволяющие сохранять иммуногенность вакцины при хранении при 4°C в течение 5 — 10 лет, при комнатной температуре — больше года. Хорошо изучена безопасность штамма *S. enterica* serovar Typhi CVD908, являющегося ауксотрофным мутантом штамма Ty2 [9, 11].

Особенностью конструирования живых сибиреязвенных вакцин на основе сальмонелл является необходимость включения систем экспорта, обеспечивающих эффективную продукцию иммуногенного белка. Наиболее часто используется система экспорта гемолизина кишечной палочки HlyA, благодаря которой антиген попадает во внеклеточную среду, проходя через внутреннюю и внешнюю мембраны. Интеграция кодирующей последовательности полной молекулы ПА (ПА83) в сочетании с системой HlyA в хромосому ауксотрофных дериватов *S. typhimurium* приводила к выраженной экспрессии ПА83 по результатам иммуноферментного анализа. Показана эффективность рекомбинантного штамма при внутривенном введении линейным мышам дозы 10^5 КОЕ. Титры специфических антител были в 2 — 4 раза выше, чем при введении того же штамма в дозе 10^9 КОЕ per os. После заражения 100 ЛД₅₀ *V. anthracis* СТИ-1 выжили 9 из 10 внутривенно иммунизированных мышей, при этом у выживших животных детектировали высокие титры специфических антител до окончания срока наблюдения (в течение 72 дней) [14]. Osorio M. et al. [37] на основе штамма *S. typhi* Ty21a сконструировали прототипы пероральной сибиреязвенной вакцины, которые различались по наличию или отсутствию системы экспорта HlyA и по промотору — htrA или nirB. Иммунизацию мышей линии A/J осуществляли трехкратно интраназально в дозе $5 \cdot 10^8$ КОЕ или трехкратно интраперитонеально в дозе $5 \cdot 10^7$ КОЕ. Максимальные титры антител по результатам ИФА (GMT 30000) и теста токсин-нейтрализации (титр 16241) наблюдали после внутрибрюшинного введения биомоделям штамма, экспрессирующего ПА с HlyA под htrA промотором. Интраназальная иммунизация тем же штаммом приводила к менее выраженному антителообразованию — GMT 3900, титр нейтрализации 1702. Тем не менее, все опытные животные выжили после интраназального заражения токсигенным бескапсульным штаммом *V. anthracis* 7702 в дозе $5 \cdot 10^9$ /мл, что позволило авторам заявить об эффективности и перспективности предлагаемого прототипа вакцины.

Для увеличения экспрессии целевого антигена и минимизации метаболической нагрузки на реципиентный штамм сальмонелл предложена система экспорта на основе эндогенного криптического гемолизина ClyA, который способствует выведению гетерологичного антигена в межклеточное пространство в составе липидной везикулы, что повышает степень его распознавания иммунной системой [13]. Было создано две конструкции на основе штамма *S. typhi* CVD908htrA. В одном случае реципиентный штамм синтезировал слитный белок ClyA-d4 (домен 4 ПА с системой ClyA) во внеклеточное пространство, а в другом — синтезировал только домен 4 ПА в цитоплазму. Линейных мышей иммунизировали двукратно интраназально в дозе 1 — $3 \cdot 10^9$ КОЕ. Титры анти-ПА антител детектировали в сыворотках крови 11 из 15 биомоделей, иммунизированных *S. typhi* CVD908htrA, экспрессирующих слитный белок ClyA-d4. В то же время, в группе мышей, которым вводили штамм, продуцирующий домен 4 ПА в цитоплазму, лишь у одного животного выявили сероконверсию. При этом у биомоделей обеих групп не регистрировали достоверных различий по числу Т-клеток, продуцирующих гамма-интерферон и интерлейкин-5. Аналогичный подход применили в 2007 году Stokes M. et al. [46]. Авторы сконструировали и провели сравнение иммуногенности штаммов сальмонелл, экспрессирующих в составе мультикопийной плазмиды полную молекулу ПА или домен 4 ПА, или слитные

домены 1 и 4 ПА в сочетании с системой экспорта ClyA. Штамм *Salmonella*, экспрессирующий полную молекулу иммуногена, при трехкратной пероральной иммунизации в дозе $1 \cdot 10^8$ — $5 \cdot 10^9$ КОЕ обеспечивал лучшую защиту от аэрозольного заражения 200 ЛД₅₀ *B. anthracis* СТИ — выжили 5 из 6 животных. В дальнейшем та же группа авторов провела сравнение двух систем экспорта белковых молекул на примере прототипов пероральной вакцины на основе штамма *S. typhi* Ty21a. Были созданы две экспрессирующие конструкции. В первом случае полноразмерный ген синтеза ПА с системой экспорта гемолизина кишечной палочки (HlyA-PA) вводили в состав низкокопийной плазмиды pVDL9.3. Во втором случае тот же ген в сочетании с системой экспорта ClyA *S. typhi* (ClyA-PA) входил в состав мультикопийной плазмиды pSEC. Мышей линии BALB/c иммунизировали штаммами *S. typhi* Ty21a(pVDL9.3PA83ec) или *S. typhi* Ty21a(pSECPA) интраназально трехкратно дозой 1 — $2 \cdot 10^9$ КОЕ. Замечено, что конструкция с ClyA-PA стимулировала в 7 раз более выраженный иммунный ответ по сравнению со штаммом с HlyA-PA. В то же время, титры токсин-нейтрализующих антител в сыворотках биомоделей были сопоставимыми: 551 ЕД₅₀ и 349 ЕД₅₀ для конструкций с HlyA-PA и ClyA-PA, соответственно [5].

Активно разрабатывалась стратегия иммунизация, включающая первичное введение рекомбинантной живой вакцины на основе штаммов *Salmonella* и последующую бустерную иммунизацию лицензированной химической вакциной AVA или рПА, адсорбированным на альгидрогеле. Преимущество предлагаемой схемы в том, что мукозальная вакцинация препаратом, экспрессирующим ПА, предположительно будет стимулировать сильный иммунный ответ и образование В-клеток памяти, следовательно, в случае акта биотерроризма примированный контингент в ответ на однократную инъекцию химической вакцины на основе ПА продемонстрирует выраженный всплеск уровня токсин-нейтрализующих антител. Эффективность прайм-бустерного варианта иммунизации показана на модели мышей и приматов. В работе Baillie L. et al. [5] у примированных мышей линии BALB/c детектировали высокий уровень защитных специфических антител в течение года наблюдения после однократной бустерной инъекции рПА. Интенсивность иммунного ответа напрямую зависела от кратности первичной иммунизации прототипом живой вакцины на основе сальмонелл. В сыворотках крови трехкратно примированных животных значения титров анти-ПА антител почти в 100 раз превышали аналогичные показатели в группе однократно примированных мышей. Galen J. et al. [10] примировали резус-макак и обезьян цинномолгус интраназально штаммом *S. typhi* CVD908htrA, экспрессирующим слитный иммуноген ClyA-ПА83, бустерную иммунизацию осуществляли рПА или AVA. Токсин-нейтрализующие антитела появлялись в сыворотках экспериментальных животных уже на 7 сутки после бустерного введения ПА. Положительные результаты были получены при использовании генно-инженерных штаммов на основе *S. typhi* Ty21a, продуцирующих ПА, для примирования новорожденных мышей. После однократной интраназальной иммунизации штаммом в дозе $1 \cdot 10^9$ КОЕ у биомоделей выявлялся высокий уровень IgA-секретирующих В-клеток и IFN- γ -секретирующих Т-клеток, в отличие от животных, иммунизированных только рПА. Бустерная внутримышечная инъекция рПА приводила к повышению титров анти-ПА IgG, токсин-нейтрализующих антител и опсонофагоцитарных антител и увеличению количества плазматических клеток и В-клеток памяти. Защитная эффективность прайм-бустерной стратегии вакцинации после внутривенного заражения мышат BALB/c 2 MLD летального токсина составила 72% при первичном двукратном введении прототипа живой сибиреязвенной вакцины, 57% — при однократном примировании. Показан также протективный эффект после интраназального заражения мышат линии A/J 100 MLD *B. anthracis* Sterne. У животных, примированных двукратно *S. typhi* Ty21a(PA) и получивших бустерную

инъекцию рПА, наблюдали лишь слабовыраженные признаки заболевания, которые исчезали к 9 дню наблюдения. Все иммунизированные мыши выжили, в то время как летальность в интактной группе составила 100% [40].

Повышение безопасности живых вакцин на основе штаммов *Salmonella* достигается путем применения современных методик, с одной стороны, облегчающих отбор трансформантов, с другой стороны, позволяющих избежать включения маркеров антибиотикорезистентности. Galen J. et al. [12] разработали и апробировали систему селекции, основанную на необходимом для обеспечения жизнедеятельности клетки белке SSB (белок, связывающий одноцепочечную ДНК). Включение последовательности, кодирующей данный белок, в плазмидную ДНК делает плазмиду абсолютно необходимой для трансформированного вектора, а ее потеря становится гибельной/летальной. В качестве платформы использовали *S. enterica* serovar Typhi, штаммы CVD908 и его производный CVD908htrA. Иммуногенность предлагаемых конструкций проверяли по титрам специфических и токсин-нейтрализующих антител в сыворотках мышей линии BALB/c, которых иммунизировали интраназально двукратно в дозе $2,5 \cdot 10^9$ КОЕ, бустерную иммунизацию проводили адсорбированным рПА. Максимальные титры специфических антител наблюдали при иммунизации штаммом *S. typhi* CVD908ssb, содержащим низкокопийную плазмиду — GMT 4929 до бустерной инъекции, постбустерное значение — GMT 500790. Уровень антител в сыворотках крови животных, *S. typhi* CVD908htrA с плазмидой с маркером устойчивости к канамицину, составили GMT 80 и GMT 13806, соответственно. Аналогичные тенденции прослеживались при анализе результатов теста определения титров токсин-нейтрализующих антител.

В работе Leckenby M. et al. [25] была предложена система на основе мутации хромосомного гена *dapD*, необходимого для стабилизации пептидогликана клеточной стенки. При конструировании штаммов нативный *dapD* промотор заменялся лактозным репрессором и оператором/промотором (*lacO/P*). После трансформации вектора мультикопийной плазмидой с *lac* оператором репрессор связывался с плазмидным *lacO*, таким образом, подавляя *dapD*, что дает возможность для роста и селекции трансформантов. Для оценки иммунизирующей активности применили трехкратную пероральную иммунизацию мышей линии A/J дозой $1 - 5 \cdot 10^8$ КОЕ генно-инженерными штаммами *S. enterica* serovar Typhimurium Zoosaloral H. Дополнительно мышам сделали бустерную инъекцию рПА. Заражение проводили интраперитонеально *V. anthracis* СТИ в дозе $5 \cdot 10^4$ спор (50 ЛД₅₀). Введение в штамм *Salmonella* стабилизированной плазмиды, несущей ген синтеза ПА83, приводило к выраженному синтезу специфических антител и защите 85% биомоделей от заражения.

Привлекательной основой для создания пероральных вакцин являются представители рода *Lactobacillus*. Препараты, содержащие лактобациллы, широко используются в качестве пробиотиков, они безопасны, не вызывают побочных реакций [32]. Сиквенс генома лактобацилл не выявил детерминант, кодирующих факторы патогенности и антибиотикорезистентности. Немаловажно, что лактобациллы способны выживать в кислой среде желудка. Помимо этого, доказаны их адьювантные свойства [52]. Клетки *Lactobacillus* содержат иммуностимулирующие компоненты, в том числе липотейхоевую кислоту и метилированную ДНК, которые способны влиять на экспрессию рецепторов врожденного иммунитета (толл-подобные рецепторы, NOD-рецепторы и пр.), располагающиеся на различных клетках, в том числе, дендритных клетках [18, 35, 45]. При иммунизации живыми рекомбинантными вакцинами на основе лактобацилл активируется и интестинальный, и системный иммунитет [38]. Аппликация лактобацилл на слизистые оболочки приводит к усилению продукции IgA.

Эффективность иммунизации препаратами на основе пробиотических микро-

организмов значительно увеличивается при использовании оригинальной стратегии доставки антигенов при помощи пептида, связывающего дендритные клетки [32]. Активация антиген-презентирующих дендритных клеток приводит к усиленной секреции провоспалительных цитокинов, привлечению Т-лимфоцитов и развитию В-клеточного ответа [36, 42, 50]. По мнению группы исследователей, использование пробиотических микроорганизмов, в частности, лактобацилл в качестве транспорта для доставки фьюжн-антигена усиливает презентацию компонентов вакцины дендритным клеткам и вызывает выраженный мукозальный иммунный ответ [31, 32].

В частности, показана эффективность штаммов *L. acidophilus*, экспрессирующих ПА, соединенный с пептидом, связывающим дендритные клетки (фьюжн-ПА). Экспериментальное подтверждение безопасности и протективности было получено на мышах линии A/J. Животным проводили комплекс инъекций экспрессирующего ПА штамма *L. acidophilus* NCFM. Первично вводили трехкратно перорально 10^9 КОЕ прототипа вакцины, через 2 недели проводили две бустерные иммунизации. Регистрировали выраженную активацию мукозальных антиген-презентирующих клеток (в частности, дендритных клеток), индукцию синтеза токсин-нейтрализующих антител, индукцию гуморального и Т-клеточного иммунного ответа, стимуляцию иммунного ответа в слизистой оболочке кишечника, высвобождение провоспалительных цитокинов дендритными клетками и макрофагами, повышение экспрессии генов патоген-распознающих рецепторов. Титры токсин-нейтрализующих антител и уровень IgA-экспрессирующих клеток были сопоставимы с показателями у мышей в группе сравнения, иммунизированных подкожно однократно адсорбированным рПА. Иммунизация биомоделей рекомбинантным штаммом *L. acidophilus* NCFM обеспечивала защиту 75% мышей (выжили 12 из 16 животных) от гибели после интраперитонеального заражения токсигенным бескапсульным штаммом *B. anthracis* Sterne в дозе $5 \cdot 10^4$ спор. Протективный потенциал не уступал защитной эффективности рПА [33].

Оптимизировать схему иммунизации позволило использование для экспрессии фьюжн-ПА высококопийной плазмиды, которая была встроена в штамм *L. gasseri*. Четырехкратная пероральная иммунизация дозой 10^8 КОЕ рекомбинантного штамма привела к 100% защите линейных мышей от заражения штаммом *B. anthracis* Sterne в дозе $5 \cdot 10^4$ спор. Хороший защитный эффект обусловлен, по мнению авторов, выраженной активацией гуморального и клеточного иммунного ответа [34]. Способность генно-инженерных штаммов *L. gasseri*, экспрессирующих ПА с пептидом, связывающим дендритные клетки, активировать интестинальный и системный иммунный ответ показана также в работе Kathania M. et al. [19]. Пероральное введение мышам C57BL/6 рекомбинантного штамма в дозах 10^7 , 10^9 и 10^{12} КОЕ стимулировало местный иммунный ответ в кишечнике, активацию клеток врожденной иммунной системы, включая дендритные клетки, что, в свою очередь, приводило к выраженному Т-клеточному иммунному ответу. Под влиянием экспрессирующего вектора *L. gasseri* происходило фенотипическое созревание дендритных клеток, а также высвобождение провоспалительных цитокинов дендритными клетками и макрофагами. Отмечалось усиление гуморального звена иммунного ответа и повышение экспрессии генов патоген-распознающих рецепторов врожденного иммунитета, включая толл-подобные рецепторы и NOD-подобные рецепторы. Необходимо отметить, что даже большие дозы *L. gasseri*, экспрессирующей фьюжн-ПА (10^{12} КОЕ), не были токсичны для мышей.

Конструирование эффективных и безопасных живых сибиреязвенных вакцин возможно на основе вирусных векторов. Сообщалось об экспрессии полноразмерного ПА и его отдельных доменов в различных вирусных векторах или частицах, таких как вирус гриппа, вирус Синдбис, капсид бактериофага T4, вирус ко-

ровей оспы, частицы репликона вируса венесуэльского энцефалита лошадей. [17, 24, 26, 27, 44, 49]. Тем не менее, самой распространенной платформой для конструирования прототипов сибиреязвенных вакцин являются аденовирусы. Как правило, аденовирусы безопасны для здоровья человека даже при использовании в высоких дозах. Аденовирусы стимулируют быстрое развитие выраженного гуморального и цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа, при этом не требуя введения в вакцинную композицию дополнительных иммуностимуляторов [48]. Простота структуры генома аденовирусов позволяет легко осуществлять генетические манипуляции, в том числе, создавать нереплицирующиеся формы, включать кодирующие последовательности любых антигенов, изменять серотип аденовирусов с целью преодоления предсуществующего иммунитета. Использование современных технологий позволяет создавать вакцинные препараты на основе аденовирусов, не теряющие иммуногенных свойств при хранении при 4 — 45°C [3].

При конструировании вакцин, защищающих от сибиреязвенной инфекции, предпринимались попытки клонирования как полной молекулы ПА, так и домена 4 ПА в аденовирусные векторы. Результаты оценки эффективности генно-инженерных конструкций, кодирующих синтез домена 4 ПА, представлены в работах McConnell M. et al. [29, 30]. В сыворотках крови мышей BALB/c, иммунизированных двукратно внутримышечно различными дозами препарата ($1 \cdot 10^7$, $1 \cdot 10^8$, $1 \cdot 10^9$ вирусных частиц), детектировали выраженный уровень анти-ПА антител, сопоставимый с таковым после иммунизации лицензированной химической сибиреязвенной вакциной. Для заражения использовали летальный токсин в дозе 4 ЛД₅₀. В группе мышей, иммунизированных максимальной в данном опыте дозой $1 \cdot 10^9$ вирусных частиц, выжило 67% биомоделей [30]. Сконструированный штамм предложено использовать для бустерной иммунизации, что приводит к значительному повышению уровня специфических антител и 100% выживаемости экспериментальных животных после заражения спорами вакцинного штамма *V. anthracis* Sterne в дозе $8,1 \cdot 10^4$ (73,5 ЛД₅₀) [29].

Tan Y. et al. [47] клонировали в состав дефектного по репликации аденовируса 5 серотипа (Ad5) полноразмерный ген *pag*, кодирующий синтез ПА83. Установлено, что однократная внутримышечная инъекция дозы 10^9 вирусных частиц приводит к выраженному антителообразованию и обеспечивает в 2,7 раза более эффективную защиту от заражения летальным токсином по сравнению с протективностью рПА, адсорбированного на альгидрогеле. В работе, опубликованной той же группой авторов в 2005 году [16], в качестве вектора был выбран вирус другого серотипа — AdC7, что обусловлено наличием у 35 — 50% людей так называемых предсуществующих антител к Ad5. Иммунизирующую эффективность сконструированного штамма тестировали на мышах, имеющих иммунитет к Ad5. Биомоделей иммунизировали однократно внутримышечно различными дозами генно-инженерного прототипа — 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} вирусных частиц. В сыворотках крови животных обнаружили высокие титры нейтрализующих антител. Степень защиты от заражения летальным токсином зависела от иммунизирующей дозы. Введение 10^{10} и 10^{11} вирусных частиц обеспечивало защиту 100 % биомоделей от внутривенного введения летального токсина возбудителя сибирской язвы.

По мнению Zhang J. et al. [55], преодолеть барьер предсуществующего иммунитета возможно путем интраназальной иммунизации. Однократная интраназальная инокуляция Ad5, экспрессирующего ПА, в дозе 10^7 вирусных частиц приводила к защите всех иммунизированных мышей линии A/J от интраназального заражения 50 ЛД₅₀ *V. anthracis* Sterne. Исследование бронхо-альвеолярной жидкости с помощью ИФА показало, что интраназальная вакцинация индуцировала выраженный синтез специфических иммуноглобулинов класса А. Специфические антитела к ПА в сыворотках иммунизированных животных де-

тектировались в течение 1 года наблюдения. В этой же работе показано, что частичную защиту (30 — 40% животных) от заражения споровой культурой обеспечивал аденовирус 5 серотипа, кодирующий ЛФ возбудителя сибирской язвы.

Потенциал ЛФ как дополнительного иммуногена был продемонстрирован и в работе Liu T. et al. [28]. В данном случае последовательности, кодирующие фрагмент ПАБЗ или ЛФ клонировали в состав адено-ассоциированного вируса 1 типа (rAAV1). При этом последовательность ЛФ содержала мутацию, препятствующую связыванию его с ПА и образованию токсичного комплекса. В качестве биомоделей использовали белых новозеландских кроликов, которым проводили однократную внутримышечную иммунизацию рекомбинантными штаммами в дозе $3 \cdot 10^{11}$. По результатам иммунологических тестов (ИФА и тест токсин-нейтрализации) иммунный ответ достигал пика на 8 неделе после иммунизации и оставался на достаточно высоком уровне до окончания срока наблюдения — 5 месяцев. Отмечалось, что нарастание титров анти-ЛФ антител начиналось в более ранние сроки по сравнению с антителами к ПА.

Рекомбинантные аденовирусы, кодирующие синтез полной молекулы ПА, способны обеспечивать защиту и от ингаляционного заражения вирулентными сибиреязвенными штаммами. Новозеландских белых кроликов однократно интраназально иммунизировали дефектным по репликации аденовирусом 5 серотипа, экспрессирующим ПА, в дозах $7,5 \cdot 10^7$, $1,5 \cdot 10^9$, $3,5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц. Выживаемость биомоделей после ингаляционного заражения 200 ЛД₅₀ спор высоковирулентного штамма *V. anthracis* Ames составила 97 — 100% [22].

Оригинальная разработка сибиреязвенной вакцины на основе вирусного вектора была предложена отечественными учеными. Созданный ими рекомбинантный аденовирус содержал фьюжн-белок, состоящий из домена 4 ПА и Fc-фрагмента Ig2a. По мнению авторов, вследствие непосредственного взаимодействия Fc-фрагмента с рецепторами клеток иммунной системы макроорганизма подобная конструкция должна стимулировать развитие выраженного клеточного и гуморального иммунного ответа. Показано, что двукратная интраназальная иммунизация $4,6 \cdot 10^9$ вирусных частиц вектора, экспрессирующего слитный белок, надежно защищала мышей линии BALB/c от внутрибрюшинного заражения 4 ЛД₅₀ бескапсульного штамма *V. anthracis* Sterne [43].

Таким образом, актуальная задача создания современных безопасных и высокоэффективных средств специфической профилактики сибирской язвы реализуется с применением широкого спектра методических приемов, генно-инженерных манипуляций. Важное значение в рациональном дизайне вакцин имеет подбор оптимальных элементов вакцинного препарата — штамма-основы, рекомбинантных плазмид, системы экспорта протеинов. Использование в качестве платформы непатогенных или вакцинных штаммов микроорганизмов и вирусов, пробиотических культур обуславливает безвредность прототипов вакцин и возможность их применения для иммунизации лиц с изменениями иммунного статуса. Иммуногенность и протективность таких препаратов определяется наличием дополнительных систем, позволяющих обеспечить успешный контакт иммуногена с эффекторными клетками иммунной системы макроорганизма. Путь введения — интраназальный или пероральный — определяет развитие реакции со стороны лимфоидных образований слизистых оболочек, а также выраженную активацию врожденного иммунитета и последующий запуск клеточных и гуморальных механизмов иммунной системы. Испытания на лабораторных животных достоверно демонстрируют эффективность прототипов живых сибиреязвенных вакцин на основе штаммов микроорганизмов родов *Salmonella*, *Lactobacillus*, аденовирусов, в том числе в схемах иммунизации, подразумевающих примирование вакцинными штаммами и бустерную иммунизацию рекомбинантным протективным антигеном.

ЛИТЕРАТУРА

1. Микшис Н.И., Попова П.Ю., Кудрявцева О.М., Семакова А.П., Новикова Л.В., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Шуковская Т.Н., Попов Ю.А., Кутырев В.В. Иммуногенность и безопасность прототипа химической сибиреязвенной вакцины на модели лабораторных животных. *Журн. микробиол.* 2014, 4: 22-30.
2. Abboud N., Casadevall A. Immunogenicity of *Bacillus anthracis* protective antigen domains and efficacy of elicited antibody responses depend on host genetic background. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008, 15 (7): 1115-1123.
3. Alcock R., Cottingham M., Rollier C. et al. Long-term thermostabilization of live poxviral and adenoviral vaccine vectors at supraphysiological temperatures in carbohydrate glass. *Sci. Transl. Med.* 2010, 2: 19ra12.
4. Alemayehu D., Utt E., Knirsch C. Vaccines: A review of immune-based interventions to prevent and treat disease. *J. Clinical Pharmacology.* 2015, 55 (S3): S93-S102.
5. Baillie L., Rodriguez A., Moore S. et al. Towards a human oral vaccine for anthrax: the utility of a *Salmonella typhi* Ty21a-based prime boost immunization strategy. *Vaccine.* 2008, 26 (48): 6083-6091.
6. Beierlein J., Anderson A. New developments in vaccines, inhibitors of anthrax toxins, and antibiotic therapeutics for *Bacillus anthracis*. *Curr. Med. Chem.* 2011, 18 (33): 5083-5094.
7. Chitlaru T., Altboum Z., Reuveny S., Shafferman A. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. *Immunol. Rev.* 2011, 239 (1): 221-236.
8. Flick-Smith H., Walker N., Gibson P. et al. A recombinant carboxy-terminal domain of the protective antigen of *Bacillus anthracis* protects mice against anthrax infection. *Infect. Immun.* 2002, 70 (3): 1653-1656.
9. Galen J., Pasetti M., Tennant S. et al. *Salmonella enterica* serovar Typhi live vector vaccines finally come of age. *Immunol. Cell Biol.* 2009, 87 (5): 400-412.
10. Galen J., Chinchilla M., Pasetti M. et al. Mucosal immunization with attenuated *Salmonella typhi* expressing anthrax PA83 primes monkeys for accelerated serum antibody responses to parenteral PA83 vaccine. *J. Infect. Dis.* 2009, 199 (3): 326-335.
11. Galen J., Curtiss R. The delicate balance in genetically engineering live vaccines. *Vaccine.* 2014, 32 (35): 4376-4385.
12. Galen J., Wang J., Chinchilla M. et al. A new generation of stable, nonantibiotic, low-copy-number plasmids improves immune responses to foreign antigens in *Salmonella enterica* serovar Typhi live vectors. *Infect. Immun.* 2010, 78 (1): 337-347.
13. Galen J., Zhao L., Chinchilla M. et al. Adaptation of the endogenous *Salmonella enterica* serovar Typhi *clyA*-encoded hemolysin for antigen export enhances the immunogenicity of anthrax protective antigen domain 4 expressed by the attenuated live-vector vaccine strain CVD 908-htrA. *Infect. Immun.* 2004, 72 (12): 7096-7106.
14. Garmory H., Titball R., Griffin K. et al. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing a chromosomally integrated copy of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene protects mice against an anthrax spore challenge. *Infect. Immun.* 2003, 71 (7): 3831-3836.
15. Germanier R., Fürer E. Characteristics of the attenuated oral vaccine strain *S. typhi* Ty 21a. *Dev. Biol. Stand.* 1983, 53: 3-7.
16. Hashimoto M., Boyer J., Hackett N. et al. Induction of protective immunity to anthrax lethal toxin with a nonhuman primate adenovirus-based vaccine in the presence of preexisting anti-human adenovirus immunity. *Infect. Immun.* 2005, 73 (10): 6885-6891.
17. Iacono-Connors L., Welkos S., Ivins B., Dalrymple J. Protection against anthrax with recombinant virus-expressed protective antigen in experimental animals. *Infect. Immun.* 1991, 59 (6): 1961-1965.
18. Kalina W., Mohamadzadeh M. Lactobacilli as natural enhancer of cellular immune response. *Discov. Med.* 2005, 5 (26): 199-203.
19. Kathania M., Zadeh M., Lightfoot Y. et al. Colonic immune stimulation by targeted oral vaccine. *PLOS ONE.* 2013, 8 (1): e55143.
20. Kaur M., Bhatnagar R. Recent progress in the development of anthrax vaccines. *Recent Pat. Biotechnol.* 2011, 5 (3): 148-159.
21. Kaur M., Singh S., Bhatnagar R. Anthrax vaccines: present status and future prospects. *Expert Rev. Vaccines.* 2013, 12 (8): 955-970.

22. Krishnan V., Andersen B., Shoemaker C. et al. Efficacy and immunogenicity of single dose AdVAV intranasal anthrax vaccine compared to anthrax vaccine absorbed in a rabbit aerosolized spore challenge model. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015, 22 (4): 430-439.
23. Lamichhane A., Azegamia T., Kiyono H. The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine.* 2014, 32 (49): 6711-6723.
24. Langley W., Bradley K., Li Z. et al. Induction of neutralizing antibody responses to anthrax protective antigen by using influenza virus vectors: implications for disparate immune system priming pathways. *J. Virol.* 2010, 84 (16): 8300-8307.
25. Leckenby M., Spear A., Neeson B. et al. Enhanced vaccine antigen delivery by *Salmonella* using antibiotic-free operator-repressor titration-based plasmid stabilisation compared to chromosomal integration. *Microbial Pathogenesis.* 2009, 46: 201-206.
26. Lee J., Groebner J., Hadjipanayis A. et al. Multiagent vaccines vectored by Venezuelan equine encephalitis virus replicon elicits immune responses to Marburg virus and protection against anthrax and botulinum neurotoxin in mice. *Vaccine.* 2006, 24 (47-48): 6886-6892.
27. Lee J., Hadjipanayis A., Welkos S. Venezuelan equine encephalitis virus-vectored vaccines protect mice against anthrax spore challenge. *Infect. Immun.* 2003, 71 (3): 1491-1496.
28. Liu T., Oscherwitz J., Schnepf B. et al. Genetic vaccines for anthrax based on recombinant adeno-associated virus vectors. *Molecular Therapy.* 2009, 17 (2): 373-379.
29. McConnell M., Hanna P., Imperiale M. Adenovirus-based prime-boost immunization for rapid vaccination against anthrax. *Molecular Therapy.* 2007, 15 (1): 203-210.
30. McConnell M., Hanna P., Imperiale M. Cytokine response and survival of mice immunized with an adenovirus expressing *Bacillus anthracis* protective antigen domain 4. *Infect. Immun.* 2006, 74 (2): 1009-1015.
31. Mohamadzadeh M. Induction of protective immunity against microbial challenge by targeting antigens expressed by probiotic bacteria to mucosal dendritic cells. *Curr. HIV Res.* 2010, 8 (4): 323-329.
32. Mohamadzadeh M., Duong T., Hoover T. Targeting mucosal dendritic cells with microbial antigens from probiotic lactic acid bacteria. *Expert Rev. Vaccines.* 2008, 7 (2):163-174.
33. Mohamadzadeh M., Duong T., Sandwick S. et al. Dendritic cell targeting of *Bacillus anthracis* protective antigen expressed by *Lactobacillus acidophilus* protects mice from lethal challenge. *PNAS.* 2009, 106 (11): 4331-4336.
34. Mohamadzadeh M., Durmaz E., Zadeh M. , Targeted expression of anthrax protective antigen by *Lactobacillus gasseri* as an anthrax vaccine. *Future Microbiol.* 2010, 5 (8): 1289-1296.
35. Mohamadzadeh M., Klaenhammer T. Specific *Lactobacillus* species differentially activate Toll-like receptors and downstream signals in dendritic cells. *Expert Rev. Vaccines.* 2008, 7 (8): 1155-1164.
36. Mohamadzadeh M., Olson S., Kalina W. *Lactobacilli* activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005, 102 (8): 2880-2885.
37. Osorio M., Wu Y., Singh S. Anthrax protective antigen delivered by *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a protects mice from a lethal anthrax spore challenge. *Infect. Immun.* 2009, 77 (4): 1475-1482.
38. Owen J., Sahay B., Mohamadzadeh M. New generation of oral mucosal vaccines targeting dendritic cells. *Curr. Op. Chemical Biology.* 2013, 17: 1-7.
39. Petosa C., Collier R., Klimpel K. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature.* 1997, 385: 833-838.
40. Ramirez K., Ditamo Y., Galen J. Mucosal priming of newborn mice with *S. typhi* Ty21a expressing anthrax protective antigen (PA) followed by parenteral PA-boost induces B and T cell-mediated immunity that protects against infection by passing maternal antibodies. *Vaccine.* 2010, 28 (37): 6065-6075.
41. Rose M. Mucosal immunization in perspective. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2014, 10 (7): 2115-2117.
42. Sahay B., Owen J., Yang T. Activation of B-cells by a dendritic cell-targeted oral vaccine. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2013, 14 (10): 867-877.
43. Shcherbinin D., Esmagambetov I., Noskov A. Protective immune response against *Bacillus anthracis* induced by intranasal introduction of a recombinant adenovirus expressing the protective antigen fused to the Fc-fragment of IgG2a. *Acta Naturae.* 2014, 6 (1): 76-84.

44. Shivachandra S., Rao M., Janosi L. et al. In vitro binding of anthrax protective antigen on bacteriophage T4 capsid surface through Hoc-capsid interactions: a strategy for efficient display of large full-length proteins. *Virology*. 2006, 345 (1): 190-198.
45. Stoeker L., Nordone S., Gunderson S. et al. Assessment of *Lactobacillus gasseri* as a candidate oral vaccine vector. *Clin. Vacc. Immunol.* 2011, 18 (11): 1834-1844.
46. Stokes M., Titball R., Neeson B. et al. Oral administration of a *Salmonella enterica*-based vaccine expressing *Bacillus anthracis* protective antigen confers protection against aerosolized *B. anthracis*. *Infect. Immun.* 2007, 75 (4): 1827-1834.
47. Tan Y., Hackett N., Boyer J., Crystal R. Protective immunity evoked against anthrax lethal toxin after a single intramuscular administration of an adenovirus-based vaccine encoding humanized protective antigen. *Hum. Gene Ther.* 2003, 14 (17): 1673-1682.
48. Tatsis N., Ertl H. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol. Therapy*. 2004, 10 (4): 616-629.
49. Thomas J., Moen S., Gnade B. et al. Recombinant Sindbis virus vectors designed to express protective antigen of *Bacillus anthracis* protect animals from anthrax and display synergy with ciprofloxacin. *Clin. Vacc. Immunol.* 2009, 16 (11): 1696-1699.
50. Tournier J., Mohamadzadeh M. Key roles of dendritic cells in lung infection and improving anthrax vaccines. *Trends Mol. Med.* 2010, 16 (7): 303-312.
51. Wang M., Gao Z., Zhang Z. Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2014, 10 (12): 3544-3551.
52. Wells J. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microbial. Cell Factories*. 2011, 10 (Suppl 1): S17.
53. Xu D., Cisar J., Poly F. Genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhi oral vaccine strain Ty21a. *Genome Announc.* 2013, 1 (4): e00650-13.
54. Zhang J., Jex E., Feng T. et al. An adenovirus-vectored nasal vaccine confers rapid and sustained protection against anthrax in a single-dose regimen. *Clin. Vacc. Immunol.* 2013, 20 (1): 1-8.

Поступила 15.06.15

Контактная информация: Попова Полина Юрьевна, к.м.н.,
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (845-2)26-21-31

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*Г.Г.Онищенко¹, А.Ю.Попова², В.В.Кутырев³, Н.И.Смирнова³,
С.А.Щербакова³, Э.А.Москвитина⁴, С.В.Титова⁴*

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА, ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ ХОЛЕРЫ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

¹Российская академия наук, Москва; ²Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва; ³Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов; ⁴Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

Обсуждаются основные проблемы действующей в Российской Федерации системы эпидемиологического надзора за холерой, а также лабораторной диагностики и вакцинопрофилактики этой особо опасной инфекции, которые возникли в современный период текущей 7 пандемии холеры. Рассматриваются также особенности генома природных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, имеющих потенциальную эпидемическую опасность, а также вопросы, возникшие при выделении таких штаммов из проб воды поверхностных водоемов при их мониторинге. Основные направления совершенствования системы эпидемиологического надзора за холерой состоят в разработке нового алгоритма дифференциации административных территорий РФ по типам эпидемических проявлений, а также оптимизации мониторинга объектов окружающей среды. Для повышения эффективности проводимой оперативной и ретроспективной диагностики в современный период необходимо внедрение в практику современных высокоинформативных техноло-