

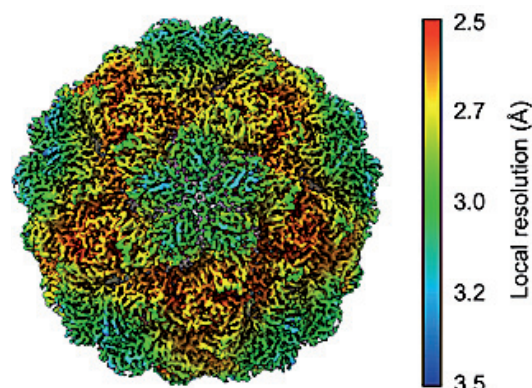
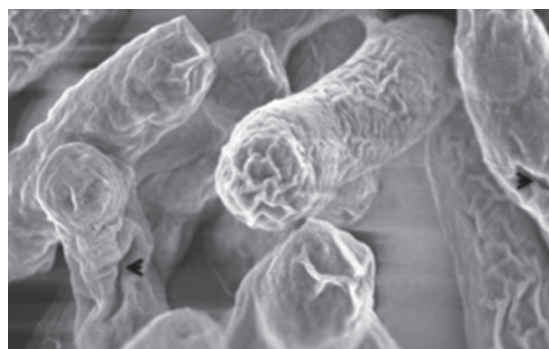
Биологические структуры для конструирования средств доставки лекарственных препаратов и вакцин к клеткам-мишеням

С развитием нанотехнологий частицы соответствующих размеров стали изучаться на предмет возможности использования для доставки лекарственных средств, в т.ч. вакцинных препаратов, в органы-мишени. Хотя, в строгом понимании, к наночастицам относят искусственно созданные элементы, к этой группе можно отнести и биологические структуры, пригодные как для инкапсулирования отдельных лекарственных или иммунодоминантных веществ, так и для их размещения на поверхности с использованием различных типов сил связывания. В этих целях в основном применяются липосомальные, неорганические, полимерные, белковые и мицеллиальные наночастицы.

Биосинтез биологических наноразмерных частиц кодируется геномом организма, поэтому они могут быть получены с высокой степенью воспроизводимости, имеют значительные по площади внутренние и внешние поверхности для связывания, достаточно низкую стоимость при получении в больших количествах, в отличие от химического синтеза.

В своих разработках ФБУН ГНЦ ПМБ уже использовал микрочастицы для конструирования вакцин на основе рекомбинантных антигенов. В частности, была разработана, запатентована и зарегистрирована вакцина против чумы на основе микрокапсулирования антигенов чумного микроба – капсульного и V. Хотя эта вакцина (первая из созданных в России для данных целей) обеспечивала достаточно приемлемый уровень протективности, но он не достигал и 50% от такового живой чумной вакцины. В связи с этим мы обратили внимание на некоторые другие перспективные частицы, в основном биологического происхождения, для осуществления эффективного инкапсулирования или адсорбирования антигенов. Одна из таких технологий, частично описанная ранее (колонки главного редактора журнала, №№ 2 и 3 за 2022 г.), основана на использовании теней бактериальных клеток.

Бактериальные тени представляют собой оболочки грамотрицательных бактерий, утратившие клеточное содержимое, не имеющие нуклеиновых кислот и других внутриклеточных компонентов. Наиболее применяемым методом получения бактериальных теней является экспрессия различных генов лизиса из природных или синтетических фагов энтеробактерий в грамотрицательных бактериях. В качестве примера можно привести кодируемый фагом эндолизин, который частично разрушает пептидогликановый слой (действует как пептидогликангидролаза), что приводит к формированию пор в бактериальной мембране и выходу клеточного содержимого за пределы оболочки. Уже имеются сообщения о получении бактериальных теней *S. Typhimurium*, *S. enteritidis*, *V. cholerae*, *H. pylori*, *H. influenzae*, *Brucella* и определены возможности их использования для создания вакцинных препаратов. Также была показана перспективность совмещения платформ для разработки вакцин, когда используются и бактериальные тени, и фрагменты ДНК, несущие гены значимых в иммуногенезе антигенов.



Эффективность использования бактериальных теней заключается в том, что они сохраняют на клеточной поверхности различные собственные структуры патогена – полисахаридные, белковые, в т.ч. мембранные, протеины, обладающие протективными свойствами. Невозможно создавать бактериальные вакцины, конструируя коктейли из множества значимых в иммуногенезе бактериальных антигенов, так как это весьма затратно с точки зрения и стоимости разработки, и процесса производства препаратов. Выходом из ситуации как раз и является использование бактериальных теней патогенов, нагруженных оптимально двумя-тремя мажорными антигенами.

Например, установлено, что при введении вакцинного штамма *Y. pestis* EV развивается гуморальный иммунный ответ более чем на 50 антигенов чумного микроба. Для кроликов иммунодоминантными являются 13 белков (Caf1, LcrV, YscB, LcrG, YopD, VirG, PsaA, OmpA, MlpA, KatY, а также белки бактериофагов, кодируемые генами *YPO2093*, *YPO2113* и *YPO2118*). Однако мажорными антигенами в иммуногенезе являются только F1 (Caf1) и V (LcrV). Все остальные антигены могут присутствовать в вакцинном препарате в интегрированном виде с тенями клеток, что и использовано в новой трехкомпонентной вакцине, показавшей высокую эффективность, и позволило выйти в текущем году на доклинические испытания препарата.

Перспективными элементами для конструирования, сходными с бактериальными тенями, являются везикулы внешних мембран бактериальной клетки грамотрицательных бактерий, которые выделяются в окружающую среду из клеточной стенки бактерий. Функцией везикул является сохранение выживаемости бактерий с помощью ингибирования антимикробных пептидов, удаление бактериальных отходов, таких как неправильно свернутые и стрессовые молекулы, перенос генов, передача факторов вирулентности и патогенности в клетки-мишени, защита от фагов и, возможно, модуляция иммунного ответа (адьювантные свойства).

Как и бактериальные тени, везикулы несут бактериальные антигены, интегрированные в мембрану, – белки внешней мембраны, которые могут вызывать ответы Т-клеток, например на CD8⁺, а также патоген-ассоциированные молекулярные структуры, такие как липополисахариды, способные стимулировать врожденный иммунный ответ. Везикулы в препаративных количествах выделяют из культуральной жидкости, куда они попадают в процессе культивирования, особенно глубокого с активным перемешиванием, использованием детергентов, например дезоксихолата, обработкой ультразвуком и др.

В мире существуют четыре зарегистрированные вакцины на основе бактериальных везикул против бактерий *Neisseria meningitidis* серогруппы В (Bexsero/4CMenB, VA MENGOСBC, MenBVac, MeNZB). Для других серогрупп нейсерий наиболее эффективны полисахаридные конъюгированные вакцины. Иммунодоминантными антигенами в вакцинах на основе везикул против *N. meningitidis* стали белки внешней мембраны: порин А (PorA), антиген, связывающий гепарин *Neisseria* (NHBA), белок, связывающий F-фактор человека (fHbp), и адгезин А *Neisseria* (NadA). Такой подход, также как для вакцин против чумы, оказался наиболее эффективным, хотя для разработки, включая идентификацию ключевых антигенов и выяснение их роли в иммуногенезе, потребовалось значительное время.

Появились также сообщения об использовании везикул для создания прототипов вакцин при переносе гетерологичных антигенов. Например, везикулы из псевдотуберкулеза использованы для доставки антигена синегнойной палочки. Везикулы сальмонелл индуцируют ответы CD4⁺ Т-клеток и выработку антител у мышей, что защищает их от заражения. Иммунизация мышей везикулами шигелл индуцировала выработку специфических антител и защищала животных от летального заражения. Предпринимались попытки использовать везикулы для вакцинации против холеры, коклюша, туберкулеза, хламидийной инфекции, сифилиса, пневмококковых пневмоний, инфекций, вызванных ацинетобактером и клебсиеллами, и даже некоторых вирусных инфекций.

На наш взгляд, для конструирования бактериальных вакцин, если выбирать между тенями клеток и везикулами, первые представляются наиболее перспективными. Во-первых, тени клеток можно получать в больших количествах из биомассы высокой плотности, хотя и для получения штамма-продуцента потребуется ряд достаточно сложных генетических манипуляций. Это в дальнейшем окупается, если речь идет о коммерческом выпуске вакцины. Получить большое количество везикул в производственном процессе – гораздо более сложная задача. Во-вторых, тени намного более стабильны, устойчивы к внешним воздействиям по сравнению с везикулами, что важно для вакцинных производств. В-третьих, тени намного проще стандартизировать по размеру, показателям содержания ключевых антигенов, осуществляя контроль физическими, оптическими и электрооптическими методами, с помощью стандартного образца сыворотки, содержания консервативных молекул (например, липополисахаридов).

Существует также относительно новый класс биологических структур бактериального происхождения, перспективный в качестве платформы для доставки терапевтических средств и вакцин. Это так называемые наноконпартаменты, или инкапсулины, представляющие собой белковые капсидоподобные комплексы с высокой молекулярной массой и регулярной структурой. Выявлено множество наноконпартаментов в зубактериях и археях, в которые включены так называемые грузовые белки, выполняющие различные функции; в т.ч. в них выявлены жизненно важные для клетки ферменты. Основными функциями инкапсулинов считаются накопление различных веществ, в т.ч. питательных в условиях голодания клеток, и возможность депонировать железо, выполняя функции вторичной ферритиновой системы и защищая клетку от действия образующегося токсичного гидроксильного радикала. Инкапсулины в основном располагаются в цитоплазме клеток и частично в культуральной жидкости, по-видимому, в результате лизиса части бактерий в популяции.

С учетом того, что наноконпартаменты высокоустойчивы к протеазам и высокостабильны, обладают развитыми внешней и внутренней поверхностями, существует реальная перспектива их использования для доставки лекарств. Генетическая или биохимическая модификация поверхности позволяет создавать конструкции, которые специфически связываются с целевыми клетками, что уже используется в модельных экспериментах по лечению онкологических заболеваний. При создании вакцин в инкапсулин может быть помещен иммунодоминантный белок, на который вырабатываются антитела (показано на белке M2 вируса гриппа), а сами структуры могут проникать в макрофаги, оставаясь там неповрежденными длительное время. Для решения таких задач необходимо развивать направление, связанное с генетическим детерминированием синтеза наноконпартаментов для целенаправленного их создания с заданными свойствами, а также технологии включения в данные структуры компонентов вакцин. Оценивая нарастающее количество научных работ по данному направлению, следует рассчитывать на появление в ближайшее время прикладных исследований по разработке прототипов носителей лекарственных средств на основе инкапсулинов.

Тени бактериальных клеток, везикулы и наноконпартаменты – это только часть биологических компонентов, перспективных для конструирования современных средств специфической профилактики инфекционных болезней. Но используя уже эти, достаточно хорошо изученные структуры, можно считать, что у нас есть предмет выбора для решения такой сложной задачи, как создание эффективных бактериальных вакцин.

*Директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии
и биотехнологии» Роспотребнадзора, академик РАН
И.А.Дятлов*