

## Genové vakcíny ( Gene Vaccines)

Srivastava I.K., Liu Margaret A.  
Ann Intern Med, Vol. 138, 2003, č. 7, s. 550 – 557  
Volně přeložil a zkrátil MUDr. Vladimír Plesník

**Souhrn:** Genové vakcíny představují novou možnost imunizace a imunoterapie, lepší než inaktivované nebo subjednotkové vakcíny. Obsahují jeden nebo několik genů, kódujících proteiny patogena. Cílem je navodit imunitu proti těm infekcím, u nichž tradiční vakcíny a terapie nejsou úspěšné, zdokonalit stávající vakcíny nebo léčit chronická onemocnění. Při jejich vývoji byl využit pokrok v mikrobiologii a molekulární biologii ke specifickému usměrnění imunitní reakce (celulární, humorální, nebo obou) pouze vůči vybraným antigenům. Tak se lze vyhnout možnému riziku nežádoucích reakcí.

Nové poznatky v imunologii a molekulární biologii umožnily vývoj DNA- a jiných genových vakcín. Na rozdíl od tradičních vakcín, které většinou k navození imunity proti infekčnímu onemocnění indukovaly tvorbu protilátek, genové vakcíny mají za úkol vyvolat cytotoxickou buněčnou a protilátkovou imunitní odpověď. Vyvíjí se genové vakcíny nejen proti infekčním onemocněním, ale i proti nádorům, alergiím a autoimunitním chorobám.

Na imunitní odpovědi se podílí buňky a protilátky. U některých původců infekce je možné účinnost očkovací látky korelovat s navozením určité hladiny protilátek v krevním oběhu očkovance. Až donedávna bylo známo jen málo možností jak navodit, nebo změřit ochrannou úroveň buněčné imunity. Dosud ani nevíme jaká úroveň buněčné odpovědi u lidí souvisí s účinnou ochranou nebo terapií. Navíc, zatím co protilátky mohou přímo atakovat původce nemoci, působení T-buněk je založeno na usmrcení infikovaných nebo nádorových buněk. Platí tedy, že T-buňky nedokážou předcházet infekci, ale umí ji udržet v mezích nebo eliminovat ji.

Namísto přímého napadení patogena jsou cytolytické T-buňky aktivovány k usmrcení buňky tím, že jejich receptor se naváže na určité molekuly jiné buňky a zjistí, že je to tělu cizí element. Receptor využívá dvojí specifčnost, to znamená, že vyhledává na povrchu cílové buňky dvě odlišné molekuly. Jednu tvoří antigen hlavního histokompatibilního komplexu třídy I (MHC-I), který je specifický pro každého jedince. Druhá molekula je peptid pocházející z bílkovin patogena, nebo nádorové buňky. T-buňka tedy pozná a je aktivována cizí, nebo abnormální bílkovinou, jsou-li její peptidy navázány na tělu vlastní molekuly MHC-I. V infikovaných nebo nádorových buňkách jsou některé nově syntetizované virové, či jiné proteiny rozloženy na peptidy a vstupují do endoplasmatického retikula buňky, kde se střetávají a vážou na nově syntetizované molekuly MHC-I. Je-li tento komplex exprimován na povrchu antigen prezentující buňky (spolu s podpůrnými stimulačními molekulami), jsou T-buňky, mající receptory specificky rozeznávající takový komplex, aktivovány a mohou infikované buňky usmrtit.

Poznatky o specifické indukci cytolytické odpovědi T-buněk se prohloubily do té míry, že je možné jich využít k očkování. Je však třeba najít způsob jak vpravit potřebné množství specifického genu přímo do antigen- prezentujících buněk.

## **Viry a bakterie jako nosiči genu (vektor)**

Viry mají vysoce vyvinuté struktury, které jim umožňují vázat se na buňky a vpravit své geny do buňky, kterou infikují. Lze užít vakcíny, obsahující živý virus, k indukci cytolytických T-buněk a užít jich k terapii nemocí, vůči nimž se uplatňuje buněčná imunita. U některých nemocí, např. AIDS, jsou však velké obavy, zda živá atenuovaná vakcína je u nich dostatečně bezpečná. Mohutnější imunitní odpověď a vyšší bezpečnost než vakcíny obsahující všechny geny patogena mohou mít vakcíny, které obsahují jen geny kódující antigen potřebný k navození žádoucí imunitní reakce. Vektorem je virus bez všech nebo bez klíčových genů, nebo virus, který je pro lidi nepatogenní a nereplikuje se u nich. Do jeho virionů se pak vloží proteinový antigen patogena (čili z jiného viru či nádorové buňky). Virus je pak vektorem, který přenáší a předává gen kódující tvorbu antigenu.

Virus-vektor sám o sobě představuje pro tělo silný antigenní podnět, někdy může vyvolat zánětlivé reakce. V závislosti na jejich typu, lokalizaci a intenzitě může být žádoucí imunitní reakce zesilována, ale i omezována. Preexistující imunita po starší infekci nebo po očkování může snížit vliv vakcíny, protože vektor je zničen dříve, než může infikovat buňky a předat jim geny přenášeného antigenu. Stejně tak opakované podání vektoru při přeočkování může být neúčelné, protože imunitní reakce vůči vektoru samotnému může eliminovat většinu jeho částic dříve, než předají geny. Výzkum intenzivně hledá mezi viry takové vektory, které by nebyly imunogenní a nevyvolávaly zánětlivé reakce.

Výzkum je také zaměřen na využití bakterií pro systémy předávání žádoucích genů do buněk. Předností bakteriálních vektorů je možnost jejich perorálního podávání, což je snazší a navíc může indukovat imunitní reakce sliznic. Pokusně bylo užito shigel, salmonel a *Listeria monocytogenes*. Vždy to musí být atenuované kmeny i když zůstávají obavy s jejich reverzí virulence, preexistující imunitou a reaktogenitou.

Nedůvěra v bezpečnost systému s živými vektory vzrostla po spolehlivě doložené reverzi vakcinálního polioviru a následném onemocnění. Příkladem může být v pokusu zjištěné uhynutí opičátka, imunizovaného atenuovaným opičím virem získaného imunodeficitu (HSV), který je u dospělých opic bezpečný a účinný. Teoretická i skutečná rizika použití virů či bakterií jako vektorů vyústila ve snahy vpravit potřebné geny do buňky jinými postupy. Zdá se, že dále popsané DNA vakcíny jsou schopné navodit celulární imunitní odpověď tak, že žádoucí geny jsou zaváděny do buněk bez možných rizik, které provází virové nebo bakteriální vektory.

## **DNA vakcíny**

Plasmidovou DNA tvoří molekula v podobě jednoduchého prstence dvojitě vázané deoxyribonukleové kyseliny, obsahující geny kódující žádoucí protein (tj. antigen v případě vakcíny) a složky, které geny potřebují pro svou expresi v jakékoliv buňce (tj. promotor na počátku genu a terminátor na jeho konci). Dříve se soudilo, že plasmidová DNA, označovaná také jako „holá DNA“, bez zvláštního vybavení a obalu, není schopna navázat se na buňku ani proniknout do jejího jádra a vyvolat tam přepis genů. V roce 1990 přinesli však Wolff a spol. přesvědčivý důkaz, že plasmidová DNA může vyvolat transfekci buněk in vivo. To ukázalo novou možnost přenosu genů in vivo i bez použití virových vektorů. S plasmidovou DNA lze podstatně snadněji zacházet při vkládání genů do ní a při produkci a purifikaci velkého množství plasmidu.

Důležitou vlastností DNA vakcín je jejich schopnost předávat geny zárodečným buňkám pro MHC-1 pomocí restrikčních endonukleáz. Tyto enzymy dovedou rozeznat a štěpit specifické sekvence DNA a v genetickém inženýrství se užívají k přípravě fragmentů DNA nesoucích specifické geny.

Ulmer se spolupracovníky zjistil, že i.m. injekce plasmidu DNA, kódujícího protein chřipkového viru, vedla u pokusných myši ke vzniku specifických cytolytických T-buněk a chránila myši před následnou čelendží živým chřipkovým virem. Nemocnost a úmrtnost infekce jiným kmenem viru chřipky, než jaký byl ve vakcíně, byla snížena. Cytolytické T-buňky rozlišují epitopy proteinů, včetně konzervativních (často vnitřních proteinů). Proto vakcína generující cytolytické T-buňky může navodit ochranu proti různým kmenům. Viry unikají imunitním reakcím tím, že pozmění (mutují) ty své části, proti nimž je zaměřena imunitní reakce. Ač takové změny mohou být jak u cytolytických T-buněk, tak protilátek proti epitopům, veliká proměnlivost virového obalu HIV a snadnost s jakou viry, např. chřipky, mění svůj zevní obal aby se vyhnuly imunitní odpovědi, představují překážku úspěchu vakcín, vedoucích k tvorbě protilátek. Naopak proteiny uložené v buňce viru se mění mnohem pomaleji a stále nesou epitopy, na němž se mohou vázat cytolytické T-buňky. Proto se dnes vývoj zaměřuje na vakcíny, které generují tyto T-buňky proti epitopům konzervativních proteinů. Byla získána ochrana před nákazou nejen kmenem viru chřipky jiného subtypu, než od něžž byl odvozen gen pro DNA vakcínu, ale také vůči kmenu, který cirkuloval před 34 lety. Na živém modelu bylo tak prokázáno, že DNA vakcíny jsou schopny produkovat zakódovaný protein, který pak může stimulovat produkci specifických ochranných cytolytických T-buněk. Tento postup přípravy nových vakcín je nyní rozšířen na řadu různých nemocí.

Jak i.m., tak i.d. vpravení DNA vede k imunitním reakcím. Ty se však mohou poněkud lišit v závislost na způsobu imunizace. Ve srovnání s jinými způsoby výroby vakcín může se výroba DNA vakcín uplatnit v mnoha ohledech. Jakmile je zvládnuta výroba a purifikace plasmidové DNA, lze podobné technologické postupy využít i k přípravě jiné DNA vakcíny, neboť se změní jen zaváděný gen. Naopak každá atenuovaná či inaktivovaná vakcína, nebo vakcína obsahující rekombinantní protein, vyžaduje zvláštní výrobní a purifikační postupy. Plasmidová DNA je relativně stabilnější než ostatní současné vakcíny. To znamená, že je vhodnější i pro transport do celého světa. Na rozdíl od vakcín obsahujících živý virus, byť je atenuovaný, je DNA vakcína ještě bezpečnější. Tím, že obsahuje jen geny kódující antigeny, proti nimž chceme navodit imunitní reakci, působí mnohem cíleněji než jiné vakcíny.

### **Reakce cytolytických T-buněk**

Počáteční zájem o DNA vakcíny vyvolala jejich schopnost navodit u modelových zvířat silnou buněčnou odpověď prostřednictvím restričních  $CD8^+$  cytolytických T-buněk MHC-1. Efektorové cytolytické T-buňky, které rozeznávají epitopy peptidů odpovídající MHC restriční složce, byly prokázány u myši imunizovaných DNA, kódující nukleoprotein virů chřipky A, HBsAg a HbcAg, i antigenů *Env* a *Gag* viru HIV. Navíc při modelové chřipkové infekci byly zjištěny cytolytické T-buňky, které rozeznávaly a usmrcovaly buňky napadené virem chřipky, lymfocytární choriomeningitidy a virem herpes simplex (HSV).

### **Protilátkové reakce**

Bylo prokázáno, že DNA vakcíny navozují protilátky proti různým bílkovinám virů, bakterií, parazitů, nádorů a eukaryontů, včetně proteinů viru chřipky, HIV, HBsAg, glykoproteinu viru lyssy, glykoproteinům B a D HSV, nukleokapsidu VH-C, HbcAg, *Mycoplasma pulmonis*, antigenu 85 *Mycobacterium tuberculosis* a proteinům tepelného šoku, antigenům plasmodií, leishmanií a schistosom.

Po podání DNA vakcíny je antigen syntetizován in situ u očkovanice. Tento postup je výhodnější než podání rekombinantního proteinu, neboť nově vzniklý antigen mnohem spíše odpovídá svou strukturou a změnám, které vznikají po přirozené infekci patogenem.

Nemálo infekčních agens vstupuje do organismu hostitele povrchem sliznic. Proto může být výhodné navodit mimo systémové reakce také tvorbu protilátek na sliznicích. Aplikace prosté plasmidové DNA do svalů, nebo tlakovým injektorem, má jen nevelkou schopnost navodit odpověď sekrečních IgA na sliznicích. Směs plasmidové DNA s různými lipidy, nebo její zavzetí do mikrogranulí, či konjugace DNA s některými chemicky definovanými nosiči, vyvolává po i.m., p.o., nebo po intranazální aplikaci na sliznicích signifikantní odpověď slizničních IgA protilátek.

### **Ochrana vyvolávaná DNA vakcínami u pokusných zvířat**

Mimo již zmíněné demonstrace účinnosti DNA vakcín proti čelendži myši virem chřipky bylo prokázáno, že DNA vakcíny chrání před chřipkou také fretky a primáty, před virem lymfocytární choriomeningitidy, morčata a myši před HSV, virem vztekliny, VH-B, před malárií a HIV u opic.

### **Kombinované vakcinační postupy**

Současný výzkum se zabývá kombinacemi DNA vakcín s jinými typy vakcín. Je-li k základnímu očkování užito DNA vakcíny, která kóduje antigen, a k přeočkování jiného typu vakcíny (např. viru, který je vektorem stejné bílkoviny), dochází k mohutnější imunitní odpovědi nebo ochraně, než je-li k přeočkování užito stejný typ vakcíny.

Začaly klinické studie k ověření bezpečnosti a imunogenity DNA vakcín u lidí. Dosavadní výsledky jsou však rozčarováním. Ačkoli prokazatelně dochází k protilátkové i celulární odpovědi, je dosažený stupeň ochrany nedostačující. Klinické studie s DNA vakcínami probíhají u různých nemocí, včetně rakoviny, chřipky, VH-B, HIV a malárie. Začala pilotní studie ke zjištění bezpečnosti a imunogenity kombinace *env/rev* DNA HIV-1 u nakažených i nenakažených osob. Neinfikované osoby, kterým byla podána nejvyšší dávka DNA vakcíny, reagovaly antigen-specifickou lymfoproliferativní odpovědí a antigen-specifickou tvorbou interferonu- $\gamma$  a  $\beta$ -chemokinů, ale tyto odpovědi byly slabé a trvaly krátce. U nakažených osob HIV-1 *env/rev* DNA vakcína bústrovala *env*-specifické protilátky, nebylo však dosaženo konsistentní odpovědi buněčné imunity vůči HIV. DNA vakcíny byly dobře snášeny při dávkách 20 – 2500  $\mu$ g, nevyvolávaly významnější lokální nebo celkové nežádoucí reakce, nikdo z očkovaných předčasně nevystoupil ze studie.

V pilotní studii s DNA vakcínami proti malárii bylo prokázáno, že tři i.m. injekce sporozoitů *Pl. falciparum* vyvolaly cytolytické CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty, závislé na T-buňkách. Přesto po očkování u žádného očkovaného nedošlo k tvorbě detekovatelných specifických protilátek. V současnosti je studována možnost použití DNA vakcín jako účinné imunoterapie u různých nádorů. Již brzy lze očekávat odpověď na to, zda podání DNA vakcín vyvolá u lidí dostatečně silnou imunitní reakci.

### **Druhá generace DNA vakcín**

DNA vakcíny založené na samotných plasmidech účinně navozují u modelových zvířat imunitní reakce a ochranu proti různým nemocem, ale v klinických studiích u lidí jsou málo účinné. Užívají se proto různé metody ke zvýšení efektivity DNA vakcín tím, že jsou směřovány na několik stádií produkce kódovaného antigenu v buňkách. V některých případech bylo zvýšené imunopotence DNA vakcín dosaženo přímou modifikací plasmidu, nebo současnou aplikací DNA plasmidu, který kóduje chemokiny, cytokiny a jiné molekuly s imunostimulačním efektem.

Jinou cestu vpravování plasmidu do buňky umožňuje přístroj generující elektrické proudy, které působí ve stěně buňky dočasné otvůrky. Ty umožňují mnohem vydatnější difuzi plasmidové DNA do buňky, což vede ke zvýšení imunogeneze DNA vakcíny. Zkoumají se i jiné postupy k jejímu zvýšení, např. absorpce DNA na povrch partikulí, která umožňuje lepší transfekci buněk *in vivo*. Ale i samotný plasmid nespecificky stimuluje tvorbu cytokinů, které prohlubují specifickou imunitní odpověď vůči kódovanému antigenu.

## **Souhrn**

Nové poznatky imunologie a molekulární biologie umožnily vývoj DNA vakcín, majících široké možnosti uplatnění. U infekcí nebo nádorů lze jich užít k prevenci i k terapii, uplatní se u autoimunních nemocí i alergie. Z hlediska technologií mohou sloužit k přípravě reagentů pro produkci monoklonálních i polyklonálních protilátek aj.

Na rozdíl od živých atenuovaných vakcín jde při aplikaci DNA vakcíny pouze o přenos genů kódujících imunogenní antigeny. Vektory se samy nereplikují, ani u nich nedochází ke zvratu avirulence, protože obsahují jen požadované genetické sekvence.

Tyto DNA a jiné na genech založené vakcíny by měly umožnit generování specifických imunitních reakcí (cytolytických T-buněk, protilátek, požadovaného typu T-helper buněk). Jejich schopnost navodit celulární i humorální odpověď může být rozhodující při přípravě vakcín, které by byly efektivní proti virovým infekcím (např. HIV), intracelulárně uloženým bakteriím (např. TBC) a parazitům (např. malárii), stejně jako proti nádorům.

110 citací, kopie uložena v archivu protiepid, odd. KHS Ostrava

## **Poznámka překladatele**

Rád sleduji pokroky medicíny, zvláště na úseku boje s infekcemi a hromadně se vyskytujícími nemocemi. Dlouhotrvající a pro praxi zdánlivě nic nepřinášející základní výzkum, dokáže nás po čase překvapivě obohatit o zcela nový pohled a přinést zcela nové možnosti prevence i terapie nemocí. Genové vakcíny jsou toho dokladem.