ВАКСИНА СРЕЩУ HIV – ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВОТО НА 21-ВИ ВЕК

Р. Аргирова

Национален център по заразни и паразитни болести

VACCINE AGAINST HIV: THE CHALLENGE OF THE 21ST CENTURY

R. Argirova

National Center of Infectious and Parasitic Diseases

Резюме:

Въпреки големите успехи на антиретровирусната терапия (HAART) и профилактиката на HIV инфекцията (медикаментозно прекъсване на предаването на вируса от бременна жена на плода ù, преекспозиционна профилактика с антиретровирусни медикаменти и др.), все още пандемията HIV/СПИН в глобален мащаб не е под контрол. Контролът може да се осъществи само ако за целите на профилактиката се въведе ефективна комбинация от превантивни стратегии, вкл. профилактична ваксина срещу HIV по подобие на редица други вирусни инфекции. Настоящият обзор прави преглед на някои от най-съвременните подходи за създаване на профилактична ваксина срещу HIV и резултатите от приложението им към края на 2011 г.

Ключови думи: HIV/СПИН, профилактична ваксина срещу HIV

Адрес за кореспонденция: *Проф. д-р Радка Аргирова, дмн, Отдел „Вирусология", НЦЗПБ, бул. "Столетов" № 44А, 1233 София, e-mail: radkaargirova@abv.bg*

Summary:

Despite the enormous successes of antiretroviral therapy (HAART) and prophylaxis against HIV-infection (medicinal discontinuation of the mother-to-child transmission of the virus; pre-exposure prophylaxis with antiretroviral drugs), the HIV/AIDS pandemic is still lacking control. It can be only achieved if effective combination of preventive strategies is introduced, including prophylactic HIV-vaccine similar to other viral infection-vaccines. This review has examined some of the most modern approaches for developing prophylactic HIV-vaccine and their post-implementation results that were reported until the end of 2011.

Key words: HIV/AIDS, prophylactic HIV-vaccine

Address for correspondence: *Prof. Radka Argirova, M. D., National Center of Infectious and Parasitic Diseases, 44A, Stoletov. Blvd., Bg – 1233 Sofia, e-mail: radkaargirova@abv.bg*

Още в началото на HIV епидемията се заговори за създаване на ефективна ваксина, на която се разчита и до днес като на средство за овладяване на пандемията, особено в развиващите се страни. От друга страна, то се подкрепя и от медицинските, социалните и психологическите последствия, породени от недостъпността на антиретровирусната терапия и мониторирането ù, с което също се внушава, че именно ваксина в глобален мащаб ще бъде решението на проблема HIV/СПИН за човечеството и ще се превърне в следващия голям триумф в историята на медицината (след ликвидирането на вариолата и полиомиелита).

Трябва обаче веднага да отбележим, че колкото и скоро да бъде получена мечтаната ваксина срещу HIV, според груби изчисления ще изминат не по-малко от 50-60 години след въвеждането ù преди ерадикацията на вируса. В течение на тези дълги години (за които все още не знаем началото на отброяването им) вече се оформя един глобален имунодефицитен резервоар. Според статистика от средата на 2010 г. в света има 45 млн. души, живеещи с HIV, други 25 млн. вече са починали (UNAIDS. Global Report: report on the global AIDS epidemic. 2010). Следователно общо около 70 млн. души от началото на епидемията са били или са с имунна

система, която не оказва съпротивление на опортюнистични инфекциозни агенти (живеещи нормално в имунокомпетентния организъм, където практически не причиняват заболяване), както и на коинфекциозни агенти. Последните, напр. вирусът на хепатит B (HBV), вирусът на хепатит C (HCV), вирусът на грипа и др. под., не са нормални обитатели на човека, но имунокомпрометираният гостоприемник е идеална среда за тяхната репликация, респ. разгръщане на съответното заболяване. Така коинфекциозните агенти "осигуряват" оцеляването си чрез адаптация, размножение и разпространение в имунокомпрометирани от HIV индивиди. В този смисъл HIV е истински двигател на еволюцията в микрокосмоса – вече има внушителен брой публикации за инфекциозни заболявания с изолирани нетипични причинители (напр. туберкулоза). У лица с HIV инфекция се откриват вируси, микроби и гъби, разчитали досега само на животински гостоприемници. Инфекциозните агенти са прескочили междувидови бариери и са се адаптирали бързо към имунокомпрометирания хазяин, а оттам до имунокомпетентния не е далеч. Бедата е, че медицината не е подготвена нито да разпознае, нито да диагностицира специфично (а какво остава да лекува) такива инфекции, които биха могли да се представят и като съвсем нови болести.

Огромната литература по въпроса за бъдещата HIV ваксина може да се обобщи със заключението, че ваксината трябва всестранно да мобилизира компонентите на имунната система. Защитата от инфекции (протекцията) би трябвало да комбинира действието на дълготрайно живеещи паметови Т-клетки – CD4, CD8 и CTL – клетъчномедииран имунитет с индуциране на неутрализиращи широкоспектърни антитела (хуморален и мукозен имунитет), насочени срещу възможно най-много вирусни субтипове и ефективни на възможно най-много входни врати на инфекцията (вкл. мукоза) [8].

Кои са главните трудности и предизвикателства за получаването на ефективна ваксина – широкоспектърна и дълготрайна – срещу HIV? Ето някои от тях (по [12]):

– Определянето на имуноген, който да индуцира хуморален, мукозен и клетъчен имунитет – срещу възможно най-широка палитра от HIV субтипове и циркулиращи рекомбинантни форми;

– Разработване на бърз, възпроизводим и надежден тест за определяне на неутрализиращи антитела срещу HIV с цел измерване ефективността на кандидат-ваксините;

– Разработване на удобен животински модел за експериментиране на кандидат-ваксините. Дефиниране на имунните корелации, осигуряващи протекцията у доброволци и експериментални животински модели;

– Разработване на стратегия за приложението на ваксината, включваща: имунизационна схема, трайност на имунния отговор в зависимост от фактори като възраст, имунен статус, предишни заболявания и имунизации и др. подобни, подбор и анализ на кандидат-ваксините в зависимост от качествата им, описани по-горе, уточняване на параметрите за изследване на доброволците и експерименталните животни в дългосрочен план, както и интерпретация на корелацията между отделните параметри в зависимост от гостоприемника, кандидат-ваксината, схемата на имунизация и др.

Изпробват се редица **подходи**, създават се нови технологии, на някои от които ще се спрем. На Световната конференция по СПИН в Рим (юли, 2011 г.) и на Европейската в Белград (октомври 2011 г.) бе докладвано, че вече разполагаме с 42 нови кандидат-ваксини. По този въпрос работят 17 целево финансирани научнолабораторни консорциума от САЩ и Европа. Ще се спрем на резултатите на най-интересните от тях. Въпреки че по дидактични съображения подходите за създаване на ваксина срещу HIV се разглеждат като такива, базиращи се на хуморален, клетъчен или мукозен имунитет, трябва да кажем, че често става дума за използване на повече от един подход.

Ваксина на базата на хуморален имунитет – неутрализиращи антитела. Засега неуспешни опити с използване като имуногени gp120

Публикуваните през 2009-2010 г. резултати от изпитанията на RV144 са изключително важни, въпреки че показаният протективен ефект при изследване на 16 000 доброволци в Тайланд бе твърде скромен – едва 31%. Нещо повече, не е наблюдавано очакваното понижение на изходните вирусни товари (set-points) на заразилите се лица. У всички ваксинирани са се образували високотитърни антитела, но със слабо изразен неутрализиращ капацитет срещу различни HIV субтипове. Механизмите на протективния имунитет при тези 31% все още не са изяснени, но хипотезата е, че известна роля играе и антитяло-зависимата клетъчна цитотоксичност (ADCC) [5].

Ваксина, способна да индуцира антитела, неутрализиращи възможно най-много варианти на HIV-1, би редуцирала драстично разпространението на епидемията. Доказателството, че не-

утрализиращите антитела предпазват срещу инфекция с вируса, идва от животински модели, при които се наблюдава стерилизиращ имунитет след пасивно прилагане на антитела. А фактът, че HIV-1 мутира, за да избегне естествено появяващите се антитела у човека, показва, че тези антитела действително блокират или елиминират вируса [14].

Подходът за създаване на ваксина срещу HIV чрез експлоатиране на хуморалния имунен отговор (неутрализиращи антитела) има предимството, че би създал стерилизиращ превантивен имунитет. Едва ли обаче това е възможно днес, когато еволюцията ни сблъсква все почесто с нарастващ брой субтипове и рекомбинантни циркулиращи форми на HIV-1 и HIV-2, за съжаление разпространяващи се в новозаразените лица, живеещи с HIV. Това означава, че е възможно нито една ваксина да не "покрива" напълно съществуващите и циркулиращи HIV варианти. Разчита се на неутрализиращи антитела, които бързо да се синтезират, да реагират при среща с възможно най-много вирусни варианти след имунизация и да ги унищожат.

Като резултат от изпитанията досега вече са получени антитела, неутрализиращи отделни вирусни изолати в условия *in vitro* – в клетъчна култура, но не с широк, т.е. обхващащ всички HIV вируси спектър (или поне най-често срещащите се причинители на инфекцията). До този момент две ваксини срещу гликопротеина gp120 на два HIV-1 варианта се оказаха неуспешни в клинични изпитания. У здрави доброволци са се образували антитела срещу gp120, но броят на нововъзникналите инфекции не се е намалил значимо [2]. Това означава, че биологичната активност на gp120 практически не се неутрализира от антитела срещу външната обвивка на вируса.

Известно е, че още преди свързването на gp120 (от HIV) с CD4+ рецептора (на таргетната клетка), консервативни и функционално важни епитопи, индуциращи неутрализиращи антитела и разположени главно във V3 на gp120, са скрити в дълбоки и недостъпни „ниши" в gp120, допълнително маскирани от гликанов щит и вариабилни структури. Така, за образувалите се антитела е трудно да достигнат и да блокират индуцираните ги епитопи – т.е. мястото на свързването между вируса (V3 на gp120) и клетката (CD4+) рецептора.

Кристалната структура на най-често използвания като имуноген вирусен гликопротеин gp120 показва, че обвивката на вируса е тример от gp120-gp41 хетеродимери. Този тример се държи стабилно благодарение на взаимодействия, включващи консервативни повърхности от gp120 (части от иначе вариабилните V3 и V2 структури), които са "невидими" на повърхността на вириона. Едновременно с това рецептор-свързващите епитопи са покрити с биохимичен "щит", съставен от аспарагин-свързани въглехидрати. Изследванията показват, че "избягването" на вируса от действието на неутрализиращите антитела се улеснява от промени в гликозилирането [17]. За съжаление началните опити за получаване на HIV ваксина се основаваха на мономерната, а не на тримерната структура на gp120.

Идеалната ваксина (действаща на принципа на неутрализиращи антитела) би трябвало да е насочена към силноконсервативна част от вирусната повърхност, обща за всички известни днес вирусни изолати. Такъв домен във вируса е т.нар. V3 – третата вариабилна бримковидна структура в гликопротеина gp120, и към него са насочени усилията сега. V3 има ограничена структурна и биологична изменчивост, като вече са идентифицирани епитопи, разпознаваеми от антитела с широка кръстосана реактивност срещу тази област, формирани у лица, живеещи с HIV. Тези антитела блокират вирусната инфекциозност, защото именно V3 е онази област от gp120, която е необходима за взаимодействие с вирусния корецептор. Една от работещите групи (ръководена от проф. С. Зола-Пазнер) изучава естествено възникналите V3-антиген/антитяло комплекси у лица, заразени със 7 най-често срещани варианти на HIV, срещу които са се формирали широконеутрализиращи моноклонални антитела (mAbs). Така са намерени общи епитопи, обуславящи широката реактивност на mAbs. Учените от тази група разполагат общите епитопи в скелета на CTB (холерен токсин Б) [18]. Така получените имуногени се изследват за антигенност in vitro и имуногенност върху зайци. Търси се продукцията на антитела след прайминг с gp120 ДНК, последван от бустинг с така приготвените антигени в скелета CTB. Тези проучвания са допринесли и за най-подробното охарактеризиране на вариабилната част от V3 – малка хидрофилна зона, като останалите 3 зони са се оказали действително висококонсервативни. Именно консервативните структури са влезли в състава на новите антигени. Вече е ясно, че срещу тези антигени в експериментални условия се образуват антитела, широконеутрализиращи няколко вирусни варианта. Това е първата стъпка към получаване на рекомбинантен имуноген/и, фокусиращ имунен отговор срещу няколко епитопа в обвивката на HIV и водещ до ефективна протективна ваксина срещу няколко HIV варианта.

Интересни са и данните относно "новите" епитопи на gp120. Бе установено, че между вирусния gp120 и CD4 рецептора се създава ковалентна връзка, водеща до нови епитопи (наречени CD4i – т.е. CD4 индуцирани), критични за следващото взаимодействие с CCR5 химиокиновия рецептор. Този нов gp120-CD4 епитоп (антиген) индуцира ширкоспектърни неутрализиращи антитела, действащи и срещу първичните изолати на различни субтипове. Целта понататък е да се интензифицира и удължи отговорът с тези неутрализиращи антитела и да се докаже тяхната протективна способност при животински модели.

Консорциумът, ръководен от Роберт Гало, предлага следния подход относно този вид неутрализиращи антитела: съгласно тяхната хипотеза антитела, насочени срещу CD4i епитопи, биха медиирали стерилизащ имунитет срещу HIV-1 [4]. Изследователите от групата вече са получили няколко панела от човешки и приматни mAbs, специфични за епитопите, представляващи антигенен комплекс от gp120-CD4. Получените антитела те разделят на групи в зависимост от различната им реактивност към gp120-CD4 комплексите или само към gp120. Интересно наблюдение в хода на експериментите е, че вирионите, асоциирани с клетъчната повърхност, изглежда масово представят CD4i-епитопи върху шипчетата на gp120. Тези резултати като че ли възстановяват увереността в постигане на стерилизиращ протективен имунитет.

Екип от учени от Франция, Швейцария, Италия и Китай [1] пък разчита на проксималния външен регион на другия гликопротеин на HIV-1 – gp41, към който се образуват неутрализиращи антитела. По биосинтетичен път те приготвят т.нар. „вирозоми" (липидни мембрани от грипен вирус, „празен" грипен вирус), съдържащи 2 имуногена – цитираната област на gp41, но съдържаща само неутрализиращи IgA епитопи (за да се осъществи „закотвянето" на вирозомата към таргетната клетка) и липид-свързания белтък P1, съдържащ известните IgA неутрализиращи епитопи 2F5 и 4E10, т.е. и двата белтъка съдържат неутрализиращи IgA епитопи с голям капацитет да блокират трансцитозата на HIV (заразяването на таргетни клетки непосредствено под мукозата), а следователно – и заразяването с него. Провеждат се имунизации на макаци с този имуноген, като се търсят титърът и трайността на неутрализиращите антитела. След интрамускулно и интраназално приложение на препарата всички животни са били протектирани от последвалата суперинфекция с HIV по вагинален път. Протектираните животни са имали IgA специфични анти-gp41 антитела с блокиращи трансцитозата на HIV-1 свойства, както и вагинални неутрализиращи и/или с антитяло-зависима клетъчна цитотоксичност (ADCC) активност IgG антитела. Най-интересното е, че в плазмата им са липсвали напълно IgG специфични анти-gp41 вирус-неутрализиращи антитела. Възниква въпросът, дали въобще циркулиращите в кръвта антивирусни антитела са задължителна предпоставка, за да има протекция от инфекцията с HIV-1. Успехът на този подход най-вероятно в близко време ще създаде и подходящ за човека препарат за недопускане вагинално на HIV, а защо не и на други полово-предавани инфекции.

Подход, разчитащ на стимулиране на Т-клетъчния имунен отговор

В основата на този подход лежи концепцията за контрол на вирусната репликация от CTLs – цитотоксичните Т-лимфоцити. Без да предизвикват стерилизиращ имунитет, тези лимфоцити разпознават заразените с HIV клетки. Контролът върху вирусната репликация се изразява с повишаването ù след намаляване на CTLs по експериментален път. С други думи, дори ако инфекцията не може да се предотврати, ваксина, базирана на CTLs, би могла да инхибира вирусната репликация и виремията (вирусния товар), да повлияе както на хода на инфекцията (по-бавно развитие, респ. достигане до СПИН), така и на разпространението на вируса (по-нисък вирусен товар – по-ниска контагиозност и епидемично разпространение).

Но HIV-1 може да "избяга" от CTLs – ако в последните се развият мутанти в Т-клетъчните епитопи. Най-важното за качествен CTL отговор е този отговор да „разпознава" именно консервативните (а не изменчивите) CTL епитопи за индивидуалните алели. CTLs могат да се индуцират само от ваксини, способни да „натоварят" вирусни пептиди върху HLA клас I молекули на дендритните клетки, представящи тези пептиди на CTLs. В следващите редове ще представим такава концепция за ваксина.

Групата на Thomas Lehner използва едновременно вродения и адаптивния имунитет за създаване на ваксина срещу HIV [16]. Целта е да се провери дали имунизация на макаци с ксеноантигени (човешки HLA) и алоантигени може да предпази или да задържи на ниско равнище инфекцията със SHIV (вирус, създаден за експериментални цели и комбиниращ части от генома на човешкия – HIV, и маймунския – SIV –

вируси на имунния дефицит). При ксеноимунизацията имуногенът съдържа човешки HLA клас I и HLA клас II молекули и/или гликопротеин на HIV, протеин на SIV и белтъци от групата „топлинен шок-протеини 70" (HSP 70), а след 16 седмици имунизираните макаци са били суперинфектирани със SHIV. Резултатите са силно намален вирусен товар или дори пълна протекция от инфекция у имунизираните животни в сравнение с контролните (неимунизирани, заразени само с вируса). Интересното е, че протектираните животни са били имунизирани с указания пълен състав на ваксината, докато ако от имуногена са били изключени HLA молекулите, у макаците е наблюдаван само спад на вирусния товар, но не и предпазване от инфекция. Установени са високи титри на неутрализиращи антитела в обратнопропорционална зависимост от вирусния товар. Тези експерименти показват, че рекомбинантните HLA са потентни имуногени, индуциращи неутрализиращи антитела с протективен спрямо инфекцията ефект [11]. От вродените антивирусни фактори при тези експерименти особено се е повишавала и концентрацията на APOBEC3G (клетъчен ензим с антивирусна активност срещу HIV и HBV, видово специфичен и силно еволюционно консервативен), също в обратнопропорционална зависимост от измерения вирусен товар. Така, неутрализиращи протектиращи антитела плюс повишаване на вродени клетъчнозащитни фактори са резултат от имунизация с HLA антигени. От същите изследователи са направени и опити за мукозна ваксина, съдържаща както човешки, така и маймунски HLA у макаци, за съжаление – безуспешни към този момент.

Пак този изследователски консорциум е предсказал *in silico* и идентифицирал гени, които съществено подобряват Т-клетъчната реактивност, специално тази на CD8+ клетките у малки животни и у примати. Целта е да се постигне дизайн на Т-клетъчния имуноген с максимална реактивност. Този проект, въпреки че е насочен към изследване на Т-клетките, дава важна допълнителна информация и за индукция на неутрализиращи антитела.

Опитът с досега използваните антивирусни ваксини показва, че в повечето случаи като че ли индуцирането на неутрализиращи антитела е достатъчно, за да е налице ефективно антивирусно действие. От друга страна, живите атенюирани вирусни ваксини стимулират освен неутрализиращи антитела, още и силни CD4- и CD8-Т-клетъчни отговори и са по-ефективни в сравнение с инактивираните или субединичните пречистени вирусни ваксини, които са слаби стимулатори на CD8-Т-клетъчния отговор. Ето защо, поради все още проблемното стимулиране на неутрализиращи антитела при инфекция с HIV, все повече привърженици печели подходът за индуциране на силен CD4- и CD8-Т-клетъчен отговор. Известно е, че HIV стимулира силен CD8-Т-клетъчен отговор в острия стадий на инфекцията, като този отговор персистира и след това. Силен CD4-Т-клетъчен отговор също се стимулира, но той е уязвим, тъй като CD4-клетките са таргетни за вируса. В същото време силният CD4-клетъчен отговор е ключов за стартиране на CD8-ефективен отговор с формиране на паметови клетки. Тъй като CD8-Т-клетките селектират HIV мутанти, избягващи от действието на имунната система, ясно е, че са необходими нов тип имунни отговори при тази инфекция.

Докато неутрализиращите антитела могат да предотвратят инфекция, CD8-клетките не могат. Цитотоксичните лимфоцити (CTL) реагират с други заразени с HIV клетки в организма и представят пептидни фрагменти от вирусните протеини, свързани с MHC клас I протеините. CD8-CTL клетките убиват заразените клетки, като по този начин намаляват значително продукцията на нови HIV вириони. Същите клетки инхибират и навлизането на HIV-1 в нови клетки чрез освобождаване на редица бета-химиокини, които се конкурират за CCR5-рецептора. Бъдещата ваксина би трябвало да стимулира висок брой CD8 паметови клетки, които бързо да освобождават цитокини и химиокини при последващ антигенен контакт и да убиват заразените клетки. Популацията на CTL клетките трябва да се разпространи и да надвиши популацията на заразените клетки, за което се изисква време. По този начин CD8 клетките практически не биха предотвратили, а само биха контролирали вирусната инфекция.

Главното предимство на ваксини, използващи т. нар. Т-клетъчен подход, е че антивирусното им действие не би трябвало да зависи от променящите се вирусни субтипове, т.е. такива ваксини биха действали срещу всички (известни днес и все още неизвестни) субтипове и рекомбинантни циркулиращи форми на HIV [7].

НОВИ ПОДХОДИ И ТЕХНОЛОГИИ ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА ИМУНОГЕНИ ЗА ВАКСИНА СРЕЩУ HIV ВЕКТОРИ

Както вече стана дума, живите атенюирани противовирусни ваксини (морбилна, полио, рубеолна, едра шарка) контролират голяма част от вирусните инфекции. Изключителната им ефективност до голяма степен се обяснява с

отслабените вирусни антигени, предизвикващи съвсем лека или асимптомна инфекция след прилагане на ваксината, като в резултат имунната система се подготвя за бърз отговор след последваща атака на вируса. Поради вирулентността на HIV, а и поради способността му да претърпява генетични промени, такъв тип ваксина не би бил удачен при HIV. Следователно идеята е да се използват непатогенни за човека живи вируси, модифицирани по такъв начин, че да носят един или повече гени на HIV, индуциращи имунитет срещу него. Цитомегаловирусът по Макакус резус (RhCMV) е естественият причинител на персистираща инфекция в тези животни, гени на SIV (вируса на маймунската имунна недостатъчност) се внасят в RhCMV и тази ваксина води до предпазване от последваща ректално внесена SIV инфекция у 50% от имунизираните животни. Сега се проверява дали същата ваксина предпазва макаците от вагинална инфекция [6]. Получените резултати потвърждават, че тази ваксина ще бъде по своя механизъм директно действаща върху мукозния имунитет.

Групата на Крис Паркс мисли и върху друг регионален имунитет – имунен отговор в лимфоидните тъкани, където се осъществява ранна репликация на HIV. За осигуряване на имунен отговор в тези места изследователите използват два вируса – един кучешки вирус (canine distemper virus – CDV – парамиксовирус, близък до морбилния вирус) и VZV (вируса на везикуларния стоматит) – и двата заразяват лимфоидните тъкани у съответните гостоприемници с развитие на задоволителен имунен отговор. Без да предизвикват заболяване у човека, тези вируси при контакт водят у него до имунен отговор. Приготвят се CDV и VZV вектори, които да произвеждат HIV протеини, индуциращи специфични за повърхността на HIV антитела и предизвизващи клетъчния имунитет да атакува заразените с HIV клетки. В края на изследователския период се предвижда да бъде избран подходящ кандидат за стартиране на клинично проучване. По подобен начин се модифицира и вирусът на Венецуелския конски енцефалит, в който са „вмъкнати" различни гени на SIV. Резултатите от имунизациите на маймуни с тези антигени тепърва ще бъдат отчетени.

Консорциумът на Letvin пък изучава имуногенността на I поколение рекомбинантни микобактериални вектори (rMyco) [10]. ***Mycobacterium bovis*** bacillus на Calmette-Guerin (BCG) е доказано непатогенен за човека, предизвиква траен имунен отговор и може да се използва като вектор, обуславящ протекция срещу инфекциозни агенти. В първото поколение rBCG векторите експресират антигени на SIV в мултигенна и неинтегрирана форма. Макаци се имунизират с тези вектори (priming), а boosting след това се прави със същите вектори или подобни рекомбинантни, но от аденовирус 5 (rAd5). Имунният отговор се мониторира чрез стандартни техники като ЕЛИСПОТ и флоуцитометрия.

Продължават усилията на групата на Pantaleo, която използва поксвирусен вектор, натоварен с вирусни протеини [9]. Тези експерименти се провеждат съгласно prime-boost стратегията (вирусна ДНК/поксвирусен вектор) и освен другото целят и подобряване на Т-клетъчния отговор (по-специално отговора от страна на CD8 клетките). За да повишат многократно имуногенността на поксвирусните вектори, се прилагат няколко стратегии: напр. делеция на вирус-специфични гени, кодиращи протеини, участващи в избягване на вродените имунни отговори; генериране на репликативно-компетентни поксвирусни вектори, както и създаване на комбиниран вектор (множествена генна делеция плюс репликативно-компетентен вектор). Имуногенността на новите вектори се проверява.

И други вирусни вектори се използват за разработване на рекомбинантни HIV ваксини – напр. вирусът на шарката по канарчетата (canarypoxvirus), адено-асоцииран вирус (AAV) и др.

Що се отнася до нови технологии за получаване на нови имуногени, не бива да пропускаме главната технология, която се използва от фирмата "Maxygen" – верижнополимеразната реакция (PCR), молекулярната фотокопирна машина на ДНК. Новата техника, предложена от Maxygen, засега е известна с името ***DNA Shuffling*** (ДНК разбъркване) [3]. При обикновената PCR ДНК се нагрява до температура, при която двойната спирала се разделя на две отделни вериги, комплементарни на праймерите, които се прикачват към нея, и процесът на копирането и намножаването на желаната порция ДНК започва. Построява се двойноспирална ДНК структура, като отделните бази (аденин, тимин, гуанин и цитозин) една след друга се закачват към комплементарните си. Сходните гени се нарязват от ензими на случайни сегменти. След това генните фрагменти се нагряват, в резултат се разделят и се подреждат в едноверижни матрици. Някои от тези фрагменти се свързват с други фрагменти, разделящи общи комплементарни ДНК региони, които на свой ред произхождат от други субтипове. Некомплементарните ДНК региони „висят" над краищата на матриците. PCR третира комплементарните региони като матрици и построява нова двойноверижна ДНК. Но

едновременно с това PCR добавя и бази към "висящите" части на праймера, като там също формира двойноспирална ДНК. Така се получават смесени химерни структури. В крайната фаза PCR събира създадените химерни структури в пълноценна по дължина генна редица, състояща се от "разбъркани" гени. Такива химерни генни варианти кодират различаващи се белтъци (антигени), всеки от които може да бъде скриниран като имуноген, а интересуващият ни генен вариант – използван след това като желан антиген с висока имуногенност. Интересното е, че техниката DNA Shuffling PCR се осъществява без синтетични праймери. Този подход вече е в ход за получаване на подходящ/и антиген/и за анти-HIV ваксина.

Към новите подходи за получаване на подходящ имуноген се отнася и включването във векторите на някои функционални гени на HIV – tat, rev, nef.

Ясно е, че съществува огромен интерес и максимално участие на световната научна общност по отношение получаването на ефективна, безопасна, убиквитерна ваксина срещу HIV, която единствено би довела до ликвидиране на тази вирусна инфекция.

Особено интересен е въпросът с използването на удобни животински модели за предклинични изпитания. Известно е, че HIV причинява заболяване само у хора и шимпанзета. Независимо от множествените сходства във вирусите причинители (респ. HIV и SIV), както и в протичането на заболяването при двата вида, налице са и съществени различия. Напр. един от функционалните гени на SIV (Vpx) не е открит в HIV-1, генният продукт на Vpu на HIV-1 пък не е открит в SIV. Действието на Vpr – друг функционален ген на вируса – се различава у двата вируса. Освен това има данни, че шимпанзетата са резистентни към изолатите с тропизъм към CCR5 корецептора. А именно към тези изолати човекът е много чувствителен. И тъй като става дума за корецептор, който е фактор от страна на гостоприемника, ясно е, че този фактор ще има отношение към отговора спрямо вируса. Всичко това означава, че въвеждането на HIV ваксината няма да е възможно без клинично изпитание на човешки модел. И конструирането на такъв модел е в ход! Той трябва да е евтин, да се размножава бързо, да се възпроизвежда заболяването, да може да се работи с голям брой животни – напр. по думите на R. Gallo: "да се използват 500 животни вместо 5 и да се чака 2 месеца вместо 2 години".

От няколко години се правят опити за създаване на трансгенни мишки – разгадан и преодолян бе проблемът за навлизането на HIV в мишите клетки чрез създаване на мишки, експресиращи човешки CD4 и човешки химиокинов рецептор върху Т-клетките си. Следващият голям проблем също бе неотдавна предолян – към заразените с HIV миши клетки бе добавен неотдавна идентифицираният човешки белтък cyclin T1, необходим на вирусния ген tat да транскрибира провирусната ДНК в мРНК. Точно тогава стана ясно, че въпреки че става възможно мишката да бъде заразена с HIV, липсва още нещо, за да се наблюдава висока вирусна продукция. Скоро се изясни, че отново става дума за фактор на гостоприемника – човешки белтък HP68, без който процесът на сглобяването на вириони, а следователно и високата вирусна продукция, не е възможен. Чак след като е бил добавен CD4 рецептор и човешкия химиокинов рецептор върху дендритни клетки (представящи HIV на Т-клетките), се е установила стабилна, разгърната in vivo инфекция, така необходима за целите на лабораторните изпитания. Това означава, че липсата на тези рецептори в мишите Т-клетки е била лимитиращият фактор, т.е. става дума за фактор на гостоприемника, в случая – от човешки произход.

Успехите в създаването на ваксина срещу HIV, макар и скромни, обнадеждават и още повече ще повишат знанията ни за възможностите за регулирането на вирусната репликация от страна на имунната система. Едновременно с това ще се засили и затвърди репутацията на ваксините въобще в областта на общественото здравеопазване.

Библиография

1. Bomsel, M., D. Tudor et A. Drillet. Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. – Immunity, 25, 2011, № 2, 269-280.
2. Buchbinder, S. et al. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity. HIV-1 Vaccine (The Step Study): a double-blind, randomized, placebo-controlled test-of-concept trial. – Lancet, 372, 2008, 1881-1893.
3. Cohen, J. How DNA Shuffling works. – Science, 293, 2001, № 5528.
4. DeVico, A. et al. Antibodies to CD4-induced sites in HIV gp120 correlate with the control of SHIV challenge in macaques vaccinated with subunit immunogens. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 2007, № 44.
5. Ferrari, G. et al. A HIV-1 gp120 envelope human monoclonal antibody that recognizes a C1conformational epitope mediates potent ADCC activity and defines a common ADCC epitope in human HIV-1 serum. – J. Virol., 2011, published online.
6. Hansen, S. et al. Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. – Nat. Med., 17, 2011, 1692.

7. H a r r e r , T. Preventive HIV-1 Vaccine. – In: HIV 2011. C. Hoffmann et J. Rockstroh. (Eds.). Hamburg, Medizin Fokus Verlag, 2011, 44-48.
8. J o h n s t o n , M. et A. Fauci. An HIV Vaccine evolving concepts. – NEJM, 356, 2007, 2073-81.
9. K i b l e r , K. et al. Improved NYVAC-based vaccine vectors. – PLoS One, 6, 2011, № 11, e25674
10. L e t v i n , L. Virology. Moving forward in HIV Vaccine development. – Science, 326, 2009, 1196-1198.
11. Mörner, A. et al. Immunization with recombinant HLA classes I and II, HIV-1 gp140, and SIV p27 elicits protection against heterologous SHIV infection in rhesus macaques. – J. Virol., 85, 2011, № 13, 6442-6452.
12. N a b e l , G. Challenges and opportunities for development of an AIDS vaccine. – Nature, 410, 2001, № 6831, 1002-1007.
13. P a d i a n , N. et al., HIV Prevention Transformed:the New Prevention Research Agenda, a review. – Lancet, 378, 2011, 269-278.
14. S t a m a t o s , L. et al. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? – Nat. Med., 15, 2009, 866-870.
15. U N A I D S . Global Report: report on the global AIDS epidemic. 2010. http://www.unaids.org/globalreport/documents/20101123_GlobalReport_full_en_.pdf
16. W a n g , Y. et T. Lehner. Induction of innate immunity in control of mucosal transmission of HIV. Review. – Curr. Opin HIV AIDS, 6, 2011, № 5, 398-404.
17. W e i , X. et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. – Nature, 422, 2003, 307-312.
18. Z o l l a - P a z n e r , S. et al. Cross-clade HIV-1 neutralizing antibodies induced with V3-scaffold protein immunogens following priming with gp120 DNA. – J. Virol., 85, 2011, № 19, 9887-9898.

Постъпил за печат на 3 януари 2012 г.

СПЕШНА КАРДИОЛОГИЯ

Под ред. на проф. д-р Младен Григоров.
II изд. С., БКИ, 2010, 350 с.

В сборника са разгледани най-честите спешни и неотложни състояния в кардиологията – като причини, които ги предизвикват, патофизиология, клиника, евакуация и лечение. Спешността в кардиологията не се обсъжда само в първите 30 минути, когато тя се свежда изключително до кардиопулмонална ресусцитация. Авторите са се постарали да посочат последователно необходимите лечебни средства и подходи в доболничния и болничния етап на спешното състояние.

Книгата е полезна за лекарите по обща медицина, в СМП и спешните центрове, за интернистите и кардиолозите.