

## ОБЗОР

---

УДК 571.27:615.281:547.96

©Мойса, Колесанова

### СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ВАКЦИНЫ

*А.А. Мойса\*, Е.Ф. Колесанова*

Государственное учреждение Научно-исследовательский институт  
биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича Российской академии  
медицинских наук, 119121, Москва, ул. Погодинская, д.10;  
тел.: 8-499-246-33-75; факс: 8-499-245-08-57; эл.почта: a.alexandr05@mail.ru

В обзоре рассматриваются этапы создания синтетических пептидных вакцин против возбудителей инфекционных заболеваний, применяемые при этом новые подходы и технологии, включая биоинформатику, геномику, протеомику, макропрепаративный пептидный синтез, методы высокопродуктивного скрининга, использование трансгенных животных для моделирования человеческих инфекций. Отмечена важная роль разработки и подбора эффективных адъювантов для пептидных иммуногенов. Приведены примеры разработки пептидных вакцин против трёх инфекционных заболеваний – малярии, гепатита С и ящура.

**Ключевые слова:** вакцины, пептиды, В-эпитопы, Т-эпитопы, иммунный ответ, малярия, гепатит С.

**ВВЕДЕНИЕ.** Вакцинация была открыта более 200 лет назад и быстро распространилась по всей Европе. Однако механизмы защитного действия вакцин долго оставались неясными. Новые вакцины начали появляться только в конце XIX века, а в основном – в последнем столетии после основательного изучения инфекционных процессов, вызывающих их микроорганизмов и механизмов иммунной защиты. В течение этого времени были разработаны эффективные вакцины, которые позволили контролировать или даже полностью элиминировать ряд опасных инфекционных заболеваний [1]. В настоящее время около 40 болезней человека контролируются вакцинацией [2]. Однако существуют инфекции, против которых пока не существует средств вакцинопрофилактики и вакцинотерапии. Такими инфекциями, в частности, являются СПИД и гепатит С [3]. Положение с этими инфекциями усугубляется тем, что не существует эффективных терапевтических средств, приводящих к полной элиминации вируса иммунодефицита человека, вызывающего СПИД [3], и средств терапии гепатита С, эффективно воздействующих на всех инфицированных вирусом гепатита С (ВГС) [3]. Это приводит к хронизации указанных инфекций (практически 100% у ВИЧ-инфицированных и 70-80% - у ВГС-инфицированных), которые фактически становятся летальными [3]. Многочисленные попытки разработать вакцины против этих заболеваний пока не увенчались успехом, однако трудности на этом пути стимулировали развитие широкомасштабных исследований взаимодействия инфекционных агентов с иммунной системой, механизмов иммунного ответа, структурных основ иммуно- и антигенности и методологии и технологии разработки вакцин нового поколения.

---

\* - адресат для переписки

Традиционные вакцины подразделяются на живые (аттенуированные микроорганизмы или вирусные культуры), убитые, или корпускулярные (инактивированные инфекционные агенты), и субъединичные, или химические (индивидуальные очищенные иммуногенные компоненты возбудителей инфекций), вакцины [2]. Вакцины последнего типа позволяют избежать побочных эффектов, возникающих после инокуляции целыми патогенными агентами. По традиционной технологии разработаны эффективные вакцины против многих инфекций [2], однако в последнее время от этой технологии часто отказываются, поскольку изготовление и использование таких вакцин связано с рядом проблем [4]:

- высокая стоимость культивирования патогенных бактерий, вирусов или простейших для промышленного производства вакцин либо иммуногенных компонентов;
- всегда есть риск утечки инфекционных агентов;
- побочные эффекты при введении, в первую очередь повышенная реактогенность, полностью не исключаемые при использовании субъединичных вакцин;
- большие затраты на очистку и детоксикацию вакцинных продуктов;
- высокая генетическая вариабельность инфекционного возбудителя, что усложняет выявление химического компонента, который может вызвать эффективный иммунный ответ против всех его штаммов;
- значительные изменения структуры и, соответственно, антигенных свойств возбудителя инфекции в ходе его жизненного цикла в организме-хозяине.

Решение этих проблем требует разработки принципиально новых подходов к конструированию вакцин на основе знаний об антигенной структуре патогена, об иммунном ответе организма на патоген и его компоненты и механизмах модификации силы и направленности этого ответа. Комплекс таких подходов, включающих арсенал методов биоинформатики, молекулярной биологии, органической химии, экспериментальной и клинической иммунологии, клеточной биологии, называемый “обратной вакцинологией”, нацелен на идентификацию, исследование антигенных и иммуногенных свойств, конструирование и получение в виде высокоочищенных препаратов принципиально новых рекомбинантных и синтетических иммуногенов и создание на их основе вакцин нового поколения [5]. К таким вакцинам относятся синтетические пептидные вакцины, рассматриваемые в данном обзоре. В нём не затрагиваются проблемы разработки противораковых вакцин, как требующие специфических подходов к их решению. Вопросам разработки таких вакцин посвящена обширная литература и, в частности, обзоры [6-8].

### **1. ЧТО ТАКОЕ ПЕПТИДНЫЕ ВАКЦИНЫ И В ЧЕМ ИХ ПРЕИМУЩЕСТВА?**

Синтетические пептидные вакцины представляют собой синтезированные из аминокислот и определенным образом организованные в единую молекулу или в надмолекулярный комплекс, либо механически смешанные фрагменты аминокислотной последовательности белка-антигена, которые распознаются иммунной системой и вызывают иммунный ответ [9]. Этот специфичный иммунный ответ может быть либо цитотоксическим Т-клеточным, либо В-клеточным, то есть направленным на выработку специфических антител, либо сочетать оба возможных пути [10]. Основными компонентами пептидных вакцин, обеспечивающих направленность и специфичность иммунного ответа, являются фрагменты белковых молекул, обладающие В- и/или Т-эпитопной активностью. Кроме того, в состав таких вакцин могут входить индивидуальные соединения либо надмолекулярные комплексы (например, мицеллы, липосомы, частицы полимеров и пр.), неспецифически или специфически активирующие определенные стадии развития иммунного ответа на пептиды и тем самым усиливающие его [11]. Для повышения химической стабильности пептиды присоединяют к носителям, обычно выступающим одновременно в качестве активаторов иммунного ответа [12].

Преимуществами пептидных вакцин по сравнению с традиционными на основе живых или убитых патогенов, субъединичных, а также рекомбинантных вакцин являются следующие [13, 14]:

- Относительно недорогие и безопасные технологии производства.
- Способность вызывать формирование иммунного ответа на те элементы структуры белка-антигена, которые в составе целой молекулы антигена обладают слабой иммуногенностью.
- Высокая степень стандартизации.
- Отсутствие компонентов, обладающих высокой реактогенностью (липополисахаридов, токсинов).
- Возможность исключения фрагментов антигена, обладающих аллергенностью и перекрёстной иммунореактивностью с собственными молекулами вакцинируемого организма.
- Возможность присоединения к носителю нескольких разных пептидов из различных антигенов.

## **2. ЭТАПЫ СОЗДАНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОЙ ПЕПТИДНОЙ ВАКЦИНЫ.**

Разработка кандидатной синтетической пептидной вакцины включает следующие этапы [5, 15]:

1. Выбор иммуноактивных пептидных фрагментов белкового(ых) антигена(ов) возбудителя инфекции и конструирование пептидного антигена (или нескольких антигенов).
2. Химический синтез пептидных антигенов, при необходимости – конъюгация их с носителем.
3. Тестирование иммуногенности полученных пептидных конструкций на лабораторных животных, определение специфичности образующихся в ответ на конструкции антител и их протективных свойств.
4. Доклинические испытания выбранных антигенов.
5. Разработка препарата кандидатной вакцины и лабораторной технологии его производства, получение опытных образцов.
6. Доклинические и клинические испытания образцов кандидатной вакцины.

Этапы 4-6 регламентированы санитарными правилами и методическими указаниями, утвержденными постановлениями Госкомсанэпиднадзора РФ [16-18]. Предметом данного обзора являются этапы 1-3.

## **3. ВЫБОР АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ДЛЯ ИММУНОГЕННОЙ КОНСТРУКЦИИ.**

Прежде всего надо принять во внимание, каков должен быть тип иммунного ответа, направленного на нейтрализацию патогена и обеспечивающего вакцинотерапию и/или вакцинопрофилактику, - цитотоксический ответ, реализуемый специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами, или специфический гуморальный, то есть образование специфических нейтрализующих антител плазматическими клетками, в которые превращаются активируемые антигеном В-лимфоциты [15]. Механизмы формирования специфического иммунного ответа на чужеродные антигены разной природы в общих чертах подробно описаны в учебных пособиях и монографиях [19, 20]. Исходя из этих механизмов обязательными компонентами вакцины, направленной на генерацию цитотоксического иммунного ответа, являются цитотоксические Т-эпитопы; часто к ним добавляют и Т-хелперные эпитопы 1 класса [14]. Обязательные компоненты вакцины, направленной на выработку антител - В-эпитопы и Т-хелперные эпитопы [14]. При этом важно, чтобы В-эпитопный компонент вакцины происходил из антигена, обладающего вирулентностью, и вырабатываемые антитела были направлены на её подавление [9].

Если антигены и факторы вирулентности возбудителя инфекции неизвестны, то в соответствии с подходом “обратной вакцинологии” они могут быть предсказаны путём компьютерного анализа структуры биополимеров, прежде всего их первичной структуры, представленной в виде нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генома и протеома. Технология

этого процесса хорошо описана в ранее опубликованных обзорах [5, 15, 21]. Для подтверждения антигенности и вирулентности предсказанных белковых молекул последние экспрессируют, тестируют на взаимодействие с антителами, полученными от больных с соответствующими инфекциями, и на способность вызывать патологические реакции у животных [5]. В настоящее время появились методы скринингового экспериментального выявления антигенов в составе протеома микроорганизмов: технология SERPA (серологический протеомный анализ; SERological Proteome Analysis) и антигеномный анализ [22-30]. Первый метод заключается в разделении двумерным электрофорезом белковых компонентов наработанного в культуре возбудителя инфекции с последующей визуализацией его антигенно активных белков путём иммуноблоттинга с антителами из сывороток крови больных с соответствующими заболеваниями [26-30]. Второй подход включает получение путём гетерологической экспрессии библиотеки белков и их фрагментов, кодируемых библиотекой фрагментов генома возбудителя инфекции, с последующим тестированием экспрессированных белков на антигенность (способность взаимодействовать с антителами из сывороток крови инфицированных) и затем на иммуногенность – в опытах по иммунизации лабораторных животных [28-30]. Антигеномный анализ исключает культивирование патогенного организма; он предпочтителен для микроорганизмов с небольшим и полностью секвенированным геномом. Технология SERPA, напротив, пригодна для выявления и характеристики первичной структуры наиболее диагностически и терапевтически значимых антигенов тех инфекционных агентов, чей геном полностью не секвенирован.

Далее решается задача выявления участков молекул, соответствующих В- и Т-эпитопам. Если известна третичная структура белка-антигена и/или его сайты связывания с антителами, нейтрализующими его вирулентные свойства, эта задача заключается в выборе и дизайне пептида (или пептидов), наилучшим образом моделирующего(их) предполагаемый или уже известный В-эпитоп [31, 32]. Однако третичные структуры антигенов известны далеко не всегда, к тому же таким образом можно выявить только В-эпитопы, но не Т-эпитопы, распознаваемые в виде линейных пептидов. Чаще всего задача выявления эпитопов сводится к их поиску исходя из аминокислотной последовательности антигена. Большим подспорьем в её решении является использование компьютерного анализа для отбора наиболее вероятных В- и Т-эпитопов. Принципиальная технология этого процесса хорошо освещена в обзорах Б.Н. Соболева и соавт. [15, 33]. Следует лишь отметить, что возможности компьютерного предсказания эпитопов постоянно расширяются: появление новой информации о картированных В- и Т-эпитопах приводит к уточнению соответствующих им паттернов и, следовательно, к повышению эффективности работы соответствующих программных продуктов; для серверов, содержащих базы данных об эпитопах, разрабатываются новые, более удобные интерфейсы, создаются объединённые серверы, позволяющие в одном и том же месте осуществлять поиск возможных В- и Т-эпитопов и составлять их в предполагаемые иммуногенные конструкции [34-42].

Однако точность предсказания В- и Т-хелперных эпитопов по аминокислотной последовательностям пока остается невысокой, и многие исследователи отдают предпочтение экспериментальному выявлению этих эпитопов, особенно учитывая, что для этого есть методики высокопродуктивного скрининга. Пептидное сканирование с использованием частично перекрывающихся фрагментов аминокислотной последовательности белка-антигена, полученных множественным параллельным синтезом, позволяет картировать как линейные В-эпитопы, так и хелперные и цитотоксические Т-эпитопы [43]. В-эпитопы выявляются путём тестирования синтезированных пептидов на взаимодействие с антисыворотками, полученными против целого белка-антигена; в качестве таковых могут выступать сыворотки крови инфицированных людей (таких исследований довольно много;

пример - антигенное картирование оболочечных белков вируса гепатита С (ВГС) [44, 45]). Помимо химического синтеза, фрагменты аминокислотной последовательности антигенов для картирования В-эпитопов получают также с помощью генно-инженерного подхода - путём создания экспрессионных библиотек фрагментов в виде химер с легко экспрессируемыми и легко очищаемыми белками [46]. Для сканирования аминокислотной последовательности антигена с целью выявления В-эпитопов используют пептиды различной длины – от 6 до 20 и более а.о.; следует, однако, заметить, что пептиды длиной более 10 а.о. могут содержать более одного линейного В-эпитопа [45]. Помимо выявления линейных В-эпитопов, предпринимаются также попытки картировать и моделировать конформационные В-эпитопы с помощью синтетических или получаемых методом фагового дисплея комбинаторных пептидных библиотек, охватывающих огромное разнообразие аминокислотных последовательностей длиной обычно от 6 до 12-15 а.о. [47]. Кроме того, определить В-эпитопы можно путём масс-спектрометрического анализа комплексов антиген-антитело, выявляя участок молекулы антигена, защищенный от протеолиза или модификации паратопом антитела [43, 48]. Фрагменты молекул антигенов, обладающих Т-эпитопной активностью, выявляют по их способности вызывать пролиферацию Т-лимфоцитов в культуре [49]. Для цитотоксических Т-эпитопов существует ограничение по длине пептида (8-11 а.о.) и требуется наличие свободных N-концевой аминогруппы и С-концевой карбоксильной группы, что обусловлено структурой связывающего “кармана” МНС I, тогда как для выявления хелперных Т-эпитопов используют более длинные пептиды, часто амидированные по С-концевой карбоксильной группе [50]. Для определения характера хелперной эпитопной активности (Th1 или Th2) используется технология ELISPOT, позволяющая проводить широкомасштабный скрининг пептидов - предполагаемых Т-хелперных эпитопов; при этом определяют набор секретируемых Т-лимфоцитами цитокинов ( $\gamma$ -интерферон, интерлейкины 2, 4, 10 и др.) после стимуляции их соответствующими пептидами [51]. В состав пептидной вакцины обычно включают такой Т-хелперный эпитоп, который обладает сродством к нескольким наиболее распространенным в данной популяции аллелям HLA (так называемый универсальный, или “неразборчивый” (promiscuous) Т-эпитоп), либо фрагмент антигена, содержащий несколько перекрывающихся Т-эпитопов различной специфичности по отношению к HLA [15, 52, 53]. В пептидные кандидатные вакцины, направленные на индукцию цитотоксического ответа, включают несколько цитотоксических Т-эпитопов различной специфичности по отношению к HLA [54, 55].

#### 4. КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЕПТИДНОГО ИММУНОГЕНА.

Объединение предсказанных или экспериментально выявленных В- и Т-эпитопов в единую иммуногенную конструкцию призвано обеспечить оптимальное распознавание иммунной системой всех компонентов конструкции. Так, объединение линейного В-эпитопа и хелперного Т-эпитопа в единую молекулу приводит к попаданию их в один и тот же В-лимфоцит, который и превратится в клетку, продуцирующую антитела требуемой специфичности [56]. Причём в аминокислотной последовательности исходной молекулы белка-антигена В- и Т-эпитопы могут располагаться далеко друг от друга; более того, они могут происходить из разных белков возбудителя инфекции и даже из разных микроорганизмов. Например, универсальный Т-хелперный эпитоп столбнячного токсина, QYIKANSKFIGITE, часто используется в иммуногенных конструкциях в сочетании с пептидными В-эпитопами различного происхождения для обеспечения широкого популяционного охвата кандидатной вакцины [52]. Соединение участка, к которому необходимо вызвать образование антител, но который обладает слабой или практически нулевой иммуногенностью в составе целого белка-антигена, с широкоспецифичным Т-хелперным эпитопом позволяет сформировать в вакцинируемом организме



гуморальный ответ такой специфичности, какой нельзя было бы достичь при иммунизации целым антигеном [56]. Как отмечалось выше, это одно из преимуществ пептидных вакцин. Для того, чтобы В- и Т-хелперная части единого пептидного антигена распознавались по отдельности соответствующими рецепторами иммунокомпетентных клеток, обеспечивают их свободное вращение друг относительно друга, вводя между В- и Т-эпитопом короткий гибкий линкер [56]. В некоторых случаях используются перекрывающиеся друг с другом В- и Т-хелперные эпитопы, так, как они располагаются в молекуле белка-антигена (пример: синтетические пептидные иммуногены из белка VP1 вируса ящура [57]).

Синтетические иммуногенные конструкции могут представлять собой как линейные олигопептиды, так и более сложные структуры - разветвлённые дендримеры (так называемые лизиновые “деревья”) [58, 59], циклические или линейные неразветвлённые олигомеры, к боковым функциональным группам которых присоединены либо отдельные В- и Т-хелперные эпитопы, либо конструкции типа Т-эпитоп–линкер–В-эпитоп/В-эпитоп–линкер–Т-эпитоп [56]. Сложные структуры менее чувствительны к протеолизу и потому более стабильны при введении в организм, в них создается более высокая локальная концентрация иммуногена [15]. Однако их труднее получать, кроме того, сложная структура их поверхности может интерферировать с распознаванием отдельных линейных В-эпитопов, входящих в их состав [59]. Оптимальное взаиморасположение В- и Т-эпитопов подбирается экспериментально путём сравнения иммуногенности конструкций различной структуры [59]. Общим правилом обеспечения эффективного иммунного ответа на В-эпитоп является лишь его близость к Т-хелперному(-ым) эпитопу(-ам). По-видимому, связывание В-эпитопа с рецептором В-лимфоцита способно защитить расположенный рядом Т-хелперный эпитоп от расщепления в эндосоме [56].

Синтетические пептидные вакцины на основе цитотоксических и Th1-хелперных эпитопов представляют собой механические смеси пептидов, соответствующих различным Т-эпитопам одного или нескольких антигенов возбудителя инфекции [50]. Создания мономолекулярной конструкции не требуется, так как эти Т-эпитопы могут связываться по отдельности с различными клетками иммунной системы, в отличие от В-Т-эпитопной конструкции.

В состав мономолекулярных иммуногенных конструкций также могут включаться компоненты, выполняющие функцию адъювантов (см. далее).

### 5. СИНТЕЗ ИММУНОГЕНА.

Пептидные компоненты синтетической вакцины получают с помощью методов твердофазного пептидного синтеза и синтеза пептидов в растворе [15, 34, 53, 58, 59]. В случае конструкций, включающих В- и Т-хелперный эпитопы, которые представляют собой довольно длинные пептиды (свыше 20 а.о.), предпочтителен автоматизированный твердофазный синтез либо сочетание твёрдофазного синтеза отдельных фрагментов иммуногена с последующей их конденсацией в растворе в единый пептид [60-63]. Твёрдофазный синтез пептидов, разработанный в начале 1960-х гг. Merrifield, в настоящее время благодаря многочисленным исследованиям и автоматизации процесса превратился практически в рутинную процедуру [60]. Основное преимущество твёрдофазного синтеза перед синтезом в растворе – отсутствие необходимости очищать целевой продукт на каждой стадии наращивания пептидной цепи, поскольку этот продукт до окончания синтеза остается ковалентно связанным с полимерным носителем, а непрореагировавшие исходные вещества, активаторы и нецелевые продукты реакции смываются током растворителя. Это значительно ускоряет процесс по сравнению с синтезом в растворе [61]. Сравнительно недавно разработан ещё более быстрый и эффективный процесс твёрдофазного пептидного синтеза использованием СВЧ-излучения, позволяющий синтезировать пептиды длиной 40 а.о. менее чем за сутки и получать хорошие выходы при синтезе пептидов,

склонных к агрегации на носителе [64]. Разумеется, для каждого пептида необходимо экспериментально подбирать наиболее эффективный регламент и исходные производные аминокислот, позволяющие получать целевой продукт с наибольшим выходом [60]. В настоящее время наиболее популярен синтез пептидов с использованием 9-флуоренил(метоксикарбонил)(ФМОК)-защищённых по  $\alpha$ -аминогруппе производных аминокислот. В отличие от синтеза с использованием *трет*-бутил(оксикарбонил)(БОК)-производных аминокислот, он не требует использования такой сильной кислоты, как HF, для снятия синтезированного пептида с носителя в конце синтеза и позволяет масштабировать твердофазный пептидный синтез до десятков и сотен килограммов пептидов [61]. Поскольку длинные (свыше 30 а.о.) пептиды порой трудно получить с хорошим выходом и отделить от примесей, отличающихся по составу на 1-2 а.о., эти пептиды синтезируют в виде 2-3 фрагментов с защищенными боковыми функциональными группами, а затем эти фрагменты конденсируют в растворе в единую молекулу [62, 63]. Такой же подход используют при конъюгации В-Т-эпитопных конструкций или отдельных эпитопов с лизиновыми дендримерами, циклическими или линейными олигомерными матричными структурами. Для конъюгации пептидов с олигомерными носителями разработаны методики хемоселективных сшивок см. обзор [56]. При этом в состав синтезируемых пептидов вводят дополнительные модифицирующие группы или а.о., чтобы структуры эпитопов в ходе сшивания оставались интактными. Наиболее часто конъюгацию проводят путём тиоалкилирования (при этом в один компонент конструкции вводят остаток цистеина, в другой – монохлорацетильную или малеимидную группу), образования гидразона или оксима (в один компонент вводят остаток серина, в котором группу  $\text{CH}_2\text{OH}$  окисляют иодной кислотой до  $\text{CHO}$ , а в другой компонент вводят остаток моногидразида янтарной или бензойной кислоты, либо остаток аминоксиксусной кислоты) и образования тиазолидинового или оксазолидинового цикла (при этом в один компонент вводят остаток серина и окисляют его  $\text{CH}_2\text{OH}$ -группу до  $\text{CHO}$ , а в другой – вводят дополнительный остаток цистеина или серина). Кроме того, ряд фирм (например, Novabiochem, Bachem, обе - Швейцария) выпускает носители для твёрдофазного синтеза пептидов с уже сформированными лизиновыми дендримерами, на которых можно проводить синтез пептидов.

## 6. АДЬЮВАНТЫ ДЛЯ ПЕПТИДНЫХ ВАКЦИН.

Важной задачей при создании любых вакцин является обеспечение сильного и длительного специфического иммунного ответа на входящие в их состав антигены. Это достигается путём дополнительной неспецифической стимуляции клеток иммунной системы, обеспечения специфической адресации антигена к иммунокомпетентным клеткам и условий их постоянной активации антигеном за счёт его депонирования и защиты от расщепления протеазами. Эти функции выполняют вводимые в препараты вакцин адъюванты (лат. *adjuvans*, *adjuvantis* - помогающий, способствующий) [12]. В вакцинах на основе аттенуированных и убитых возбудителей заболеваний такую роль играют структурные элементы самих возбудителей – клеточные стенки, мембраны и их компоненты (полисахариды, липополисахариды, фосфолипиды и т.д.) [2, 12]. В субъединичные вакцины обычно добавляют адъюванты, способствующие депонированию антигенов (путем их сорбции) и неспецифической стимуляции иммунного ответа (привлечение лимфоцитов и макрофагов к месту введения за счет формирования местной воспалительной реакции), обычно это соли или гидроокись алюминия [2]. При разработке синтетических пептидных вакцин подбор адъюванта приобретает особую роль, так как пептиды, как правило, хорошо растворимы в водных растворах, подвержены протеолизу и не депонируются в месте введения. Пептидные конструкции нацелены на активацию узкоспецифического иммунного ответа и не обеспечивают привлечения и активации клеток-участников неспецифического иммунного ответа, усиливающих и направляющих специфичный

ответ. Соли и гидроокись алюминия непрочно сорбируют пептиды, слабо активируют иммунокомпетентные клетки и не усиливают иммунный ответ на пептидные антигены [53]. Поиск новых адъювантов для пептидных вакцин против инфекционных заболеваний человека идёт среди адъювантов, разрешённых к использованию на животных, и различных иммуномодуляторов [12, 53].

Адъюванты на масляной основе, например, полный адъювант Фрейнда (содержит суспензию убитых туберкулёзных микобактерий или их липополисахаридов в минеральном масле с ланолином), давно применяют в лабораторных исследованиях иммуногенности на животных [65]. Адъювант Фрейнда слишком токсичен, обладает высокой реактогенностью и может вызывать образование некротических язв в месте инъекций [65]. Однако в настоящее время разработаны менее токсичные и реактогенные адъюванты на масляной основе (серии Montanide), которые используются в ряде пептидных вакцин, проходящих клинические испытания [49, 66].

В качестве адъювантов также используют сапонины (например, QuilA – экстракт из *Quillaja saponaria*, в котором идентифицированы 23 различных сапонины), растительные гликозиды с поверхностно-активными свойствами, образующие в растворе мицеллы. QuilA слишком токсичен для использования у людей, но полученная из него фракция QS-21 менее токсична, индуцирует эффективный Т-клеточный ответ против антигенов и перспективна для применения в пептидных вакцинах [67-70]. Сапонины используются как адъюванты в составе иммуностимулирующих комплексов – ISCOMs (Immunostimulating complexes), представляющих собой смешанные мицеллы сапонины и холестерина размером 40 нм, в которые встраиваются гидрофобные или амфипатические антигены. ISCOMs являются удобной системой доставки антигена к антигенпрезентирующим клеткам, эти частицы способны быстро проникать внутрь клеток, что повышает эффективность презентации антигенов [64, 71].

Улучшение транспортировки пептидных антигенов в антигенпрезентирующие клетки происходит и при использовании в качестве адъювантов поликатионов – поли-L-лизина и поли-L-аргинина [55, 72]. Эффективность полимерного поликатиона полиоксидония, неспецифически активирующего клеточный иммунный ответ [73], в качестве адъюванта синтетических пептидных вакцин остаётся под вопросом [74].

В настоящее время широко применяются адъюванты, синтезированные на основе различных патоген-ассоциированных уникальных высококонсервативных молекулярных структур, не имеющих аналогов в макроорганизме, и запускающих неспецифический иммунный ответ через образ-распознающие рецепторы, например Толл-подобные рецепторы (TLR). [71, 75-77]. Одной из таких молекулярных структур является дипальмитоил-глицерил-S-цистеин (Pam<sub>2</sub>Cys) [75-78], синтетический аналог липидного фрагмента макрофаг-активирующего липопептида-2, выделенного из мембраны *Mycoplasma fermentans* [79]. Pam<sub>2</sub>Cys используется, в частности, в составе кандидатной синтетической пептидной вакцины против вируса гепатита С, состоящей из цитотоксического HLA-A2-специфичного Т-эпитопа белка NS5B ВГС и CD4+ Т-хелперного эпитопа Р25 из белка слияния чумы плотоядных [79, 80]. В синтетических пептидных конструкциях используют и другую липидную группу, Pam<sub>3</sub>Cys, представляющую N-концевой остаток липопротеина *E. coli* [81-83]. Иммуногенные конструкции на основе пептида, ковалентно связанного с Pam<sub>3</sub>Cys, вызывают эффективный иммунный ответ и при парентеральном, и при интраназальном введении, при этом образуются защитные антитела, относящиеся к иммуноглобулинам класса А [84], что важно для индукции иммунного ответа в слизистых оболочках.

Часто пептидные конструкции с остатками жирных кислот, а также гидрофобные пептиды включают в состав липосом. Антигены, ассоциированные с липосомами, защищены от разрушения протеазами и попадают непосредственно



в антигенпрезентирующие клетки, что усиливает иммунный ответ [62, 85]. Кроме антигенов в липосомы включают белки, способствующие слиянию мембран липосом и клеток, например, гемагглютинин вируса гриппа; такие частицы называют виросомами [86] (рисунок). Виросома повторяет естественный путь вирусной частицы, и на поверхности антигенпрезентирующей клетки фрагмент антигена экспонируется в комплексе с МНС II, то есть в том виде, который узнаётся Т-хелперами. Включение антигена в наночастицы размером 20-40 нм (виросомы, липосомы, ISCOMs) улучшает его презентацию, поскольку такие частицы быстро поглощаются антигенпрезентирующими дендритными клетками [86, 87].

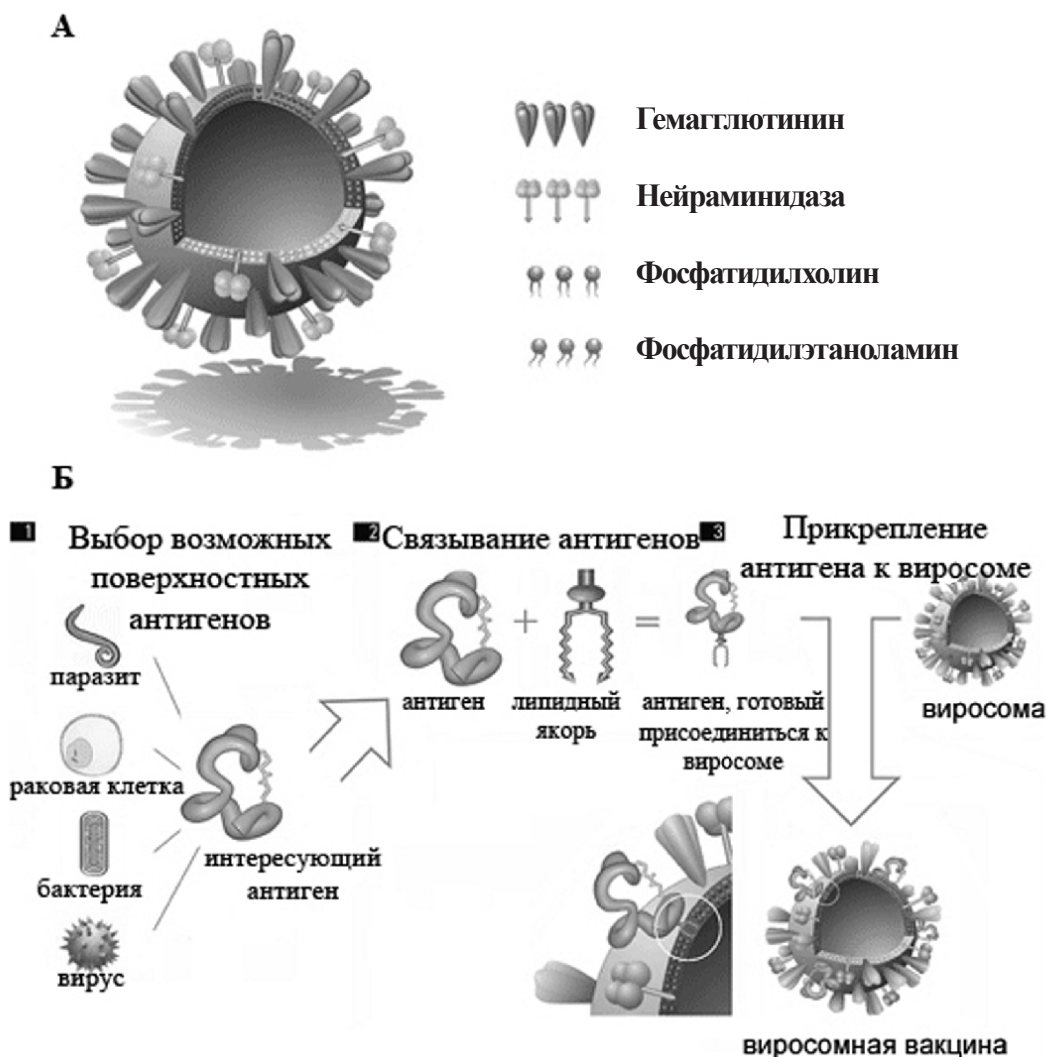


Рисунок.

Вакцина на основе виросом: А - строение виросомы; Б - этапы создания виросомной вакцины.

Для депонирования и защиты от протеолиза антигены, помимо липосом и ISCOMs, могут включать также в биodeградируемые полимерные микросферы. Такие микрокапсулы размером до 10 мкм, состоящие из полилактида, полигликолида или их сополимера, позволяют вводить антигены перорально, поскольку не растворяются в желудочном соке, и обеспечивать постепенное высвобождение антигена [88, 89].

## **7. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И ПРОТЕКТИВНОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ИММУНОГЕНЫ.**

Исследование пептидных конструкций начинают с определения их иммуногенности, то есть способности вызывать запрограммированный при их создании иммунный ответ [15, 33, 53]. Если пептидный иммуноген включает В- и Т-хелперный эпитопы, то он должен вызывать образование антител как против входящего в его состав В-эпитопа, так и против белка, из которого взят фрагмент, соответствующий В-эпитопу; обычно это проверяют на лабораторных животных. Чем больше доля животных, развивших такой иммунный ответ среди общего количества иммунизированных, тем более универсальным является включенный в состав конструкции Т-хелперный эпитоп. Иммуногенность смеси пептидов, соответствующих цитотоксическим Т-эпитопам, вначале определяют по появлению у иммунизированного животного цитотоксических Т-лимфоцитов соответствующей специфичности [50, 81]. Далее эффективность цитотоксического иммунного ответа оценивают в смешанной культуре клеток - по степени разрушения клеток, зараженных возбудителем инфекции, под действием цитотоксических Т-лимфоцитов, полученных от иммунизированных животных или стимулированных изучаемыми пептидными иммуногенами в культуре [89]. Протективность специфического гуморального ответа, вызванного введением пептидного иммуногена, определяют по нейтрализующему действию антител на проникновение возбудителя инфекции в клетку-мишень или по инаktivации токсина, выделяемого возбудителем [15, 33, 90]. Если данному заболеванию подвержены животные, то исследование протективного действия иммунизации пептидным антигеном проводят на них. С точки зрения лабораторного содержания наиболее приемлемыми моделями животных являются лабораторные линии мелких грызунов. Однако бывает, что ни один из видов лабораторных животных не подвержен исследуемому заболеванию. В таких случаях в качестве моделей используют иммунодефицитных (SCID) мышей с ксенотрансплантированными клетками или тканями человека (для малярии – SCID мыши с пересаженными эритроцитами человека [91], для гепатита С - SCID мыши с пересаженной тканью печени человека [92, 93]), либо исследователи ограничиваются тестированием протективности иммунного ответа на клеточных культурах. Например, тестирование вируснейтрализующей активности антител, вырабатываемых в ответ на антигены вируса гепатита С, проводят в экспериментах по блокированию проникновения самого вируса или вирусоподобных частиц, несущих на поверхности оболочечные белки ВГС, в первичные гепатоциты или в клетки гепатомы в культуре [94].

Важна не только сила протективного иммунного ответа, но и его длительность после последнего введения иммуногена. Если возбудитель обладает высокой генетической вариабельностью и изменчивостью, следует выяснить, насколько штамм- и изолят-специфичным будет иммунный ответ на данный пептидный иммуноген. Только по завершении этого этапа исследования синтетической пептидной иммуногенной конструкции она может быть направлена на доклинические и клинические испытания [5, 15, 33].

## **8. ПРИМЕРЫ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДНЫХ ВАКЦИН, ДОШЕДШИХ ДО СТАДИИ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ**

### **8.1. Пептидные вакцины против малярии.**

Разработка пептидных вакцин против малярии была начата в 1970-х годах, и, несмотря на первые неудачи, продолжается как перспективная до сих пор [95]. Возбудитель – малярийный плазмодий – проходит несколько стадий развития в организме человека, и на каждой стадии его белковые и, соответственно, антигенные, структуры различаются. Идентифицировано 40 перспективных протективных антигенов плазмодия, на основе которых разрабатываются различные типы противомаларийных вакцин, нацеленных на разные стадии жизненного цикла паразита. Интерес к разработке пептидных вакцин вызван генетическими и, соответственно, антигенными различиями локальных популяций

плазмодия, что не позволяет сформировать изолят-неспецифичный протективный иммунный ответ при введении целого возбудителя или его белковых антигенов, принадлежащих одному из многих штаммов [96]. Кроме того, с помощью синтетических пептидов легче создать мультиантигенную вакцину, которая вызывала бы формирование иммунного ответа против различных стадий развития паразита при минимальной реактогенности.

В 1980 г. начались клинические исследования первой синтетической противомаларийной вакцины Spf66, направленной против *Pl. falciparum* в стадии бесполого развития [97]. Эта вакцина состояла из трех фрагментов трех различных поверхностных антигенов мерозоита с повторяющимся фрагментом белка CS спорозоита, PNANP, между ними. Однако эффективность Spf66 в клинических испытаниях сильно различалась в зависимости от географической области их проведения, и дальнейшие испытания её были прекращены [98].

В настоящее время на различных стадиях клинических испытаний находятся три пептидные кандидатные вакцины против малярии. Две из них содержат длинные (свыше 70 а.о.) синтетические пептидные иммуногены, вызывающие образование антител к двум различным поверхностным белкам плазмодия на стадии шизонта – поверхностному белку мерозоита 3 (MSP-3) и глутамат-богатому белку (GLURP): соответственно MSP-3-LPS (Long synthetic protein) (MSP-3(186-276)) [99] и GLURP-LPS (GLURP(85-213)) [100-103]. Эти высококонсервативные для всех изолятов плазмодия пептидные иммуногены вызывали образование цитофильных антител IgG1 и IgG3 подклассов, которые, опсонизируя шизонты, привлекали к ним моноциты, вызывающих лизис шизонтов [104]. Фазы I клинических испытаний этих вакцин [105] продемонстрировали формирование длительного (не менее 1 года) иммунного ответа на эти вакцины. На данный момент продолжается фаза 2b клинических испытаний вакцины MSP3-LSP [106].

Проводятся также клинические испытания (I фаза) препаратов виросомальных пептидных вакцин PEV302 и PEV301 на основе фрагментов белка CS спорозоита и апикального мембранного антигена 1 (AMA-1), разработанных совместно Швейцарским тропическим институтом и фирмой Pevion Biotech Ltd [107]. PEV302 представляет собой 39-членный циклический пептид, содержащий пять высококонсервативных повторов NPNA из белка CS, конъюгированный с фосфатидилэтаноламином и включённый в мембрану фосфолипидной частицы вместе с гемагглютинином вируса гриппа [107]. PEV301 – аналогичный виросомальный препарат, содержащий другой пептид – 49-членный, включающий относительно консервативную петлю I III домена белка AMA-1, также конъюгированный с фосфатидилэтаноламином. Показано, что оба пептид-содержащих виросомальных препарата вызывали образование антител, ингибирующих инвазию спорозонтами клеток печени и эритроцитов [107-109].

## 8.2. Синтетические пептидные вакцины против ВГС.

Вирус гепатита С (ВГС) обладает чрезвычайно высокой генетической вариабельностью и изменчивостью, и потому использование классического подхода к разработке вакцины, основанного на получении ослабленного или инактивированного штамма вируса, в случае ВГС малоэффективно [3]. Это обусловило необходимость применения нетрадиционных подходов к разработке вакцин против гепатита С, в частности, синтетических пептидных вакцин. Характерные для оболочечных белков ВГС высокая вариабельность аминокислотной последовательности и наличие в их молекулах большого числа гликозильных остатков, таких же, как в гликопротеинах организма-хозяина, позволяют этим белкам избегать иммунного ответа и затрудняют разработку эффективных изолят-неспецифичных антигенов, направленных на активацию выработки нейтрализующих антител [110]. В то же время была показана роль цитотоксического иммунного ответа в элиминации ВГС у спонтанных реконвалесцентов [111, 112]. Это предопределило разработку терапевтических

пептидных вакцин, направленных на стимуляцию цитотоксического ответа на вирус. Эти кандидатные пептидные вакцины против ВГС представляют собой либо смесь нескольких пептидов, либо один мультиэпитопный полипептид.

### 8.2.1. Синтетическая пептидная вакцина IC41.

IC41 - терапевтическая кандидатная вакцина компании Intercell AG (Австрия) - содержит 5 синтетических пептидов (2 фрагмента кор-белка, 23-44 и 132-140; 2 фрагмента неструктурного белка NS3, 1073-1081 и 1248-1261; один фрагмент белка NS4, 1764-1786; все фрагменты взяты из ВГС, генотип 1a, нумерация а.о. приведена по аминокислотной последовательности полипротеина ВГС) и адъювант поли-L-аргинин, стимулирующий проникновение пептидных антигенов внутрь клеток. В составе этих пептидов три Т-хелперных эпитопа (кор-белок 23-44, NS3 1248-1261, NS4 1767-1786) и пять HLA-A2-специфичных цитотоксических Т-эпитопов (кор-белок 35-44 и 132-140, NS3 1073-1081 и NS4 1764-1772) [113, 114]. Фрагменты 23-44, 132-140, 1248-1261, 1764-1772 консервативны для различных генотипов ВГС (степень идентичности их последовательностей в субтипах 1a, 1b и 2 не ниже 87%) [113]. Фрагмент NS3 1073-1081 различается в разных генотипах ВГС (степень идентичности не более 15%), однако разработчики вакцины всё же использовали этот пептид как один из эффективных Т-эпитопов, характерных для часто встречающегося в Европе генотипа ВГС 1a [115]. Фаза I клинических испытаний показала, что вакцина IC41 индуцирует образование ВГС-специфичных CD8+ Т-лимфоцитов у здоровых людей и хорошо переносится [115]. В фазе 2 клинических испытаний у пациентов с хроническим гепатитом С и аллелью HLA-A2, которым ввели 6 доз вакцины с интервалом в 4 недели, содержание циркулирующей РНК ВГС не уменьшилось, но у 25% пациентов наблюдалось увеличение количества ВГС-специфичных CD8+-лимфоцитов [113]. В другом исследовании у 66% пациентов с хроническим гепатитом С (генотип 1), не поддающихся стандартной терапии, через 6 месяцев после окончания вакцинирования IC41 было обнаружено небольшое, но статистически значимое снижение РНК ВГС [116].

### 8.2.2. Синтетическая пептидная вакцина на основе виросом.

Данная вакцина разрабатывается компанией Pevion Biotech Ltd. и находится в фазе I клинических испытаний. Оболочка виросомы состоит из фосфолипидов, в которые включены гемагглютинин и нейраминидаза вируса гриппа. Содержимое виросомы представлено синтетическим фрагментом кор-белка ВГС длиной 132 а.о., который индуцирует образование вирусспецифических цитотоксических и продуцирующих  $\gamma$ -интерферон Т-клеток у HLA-A2.1 трансгенных мышей [117, 118].

### 8.3. Синтетическая вакцина против ящура.

Хотя существующая инактивированная вакцина против ящура во многих случаях способна эффективно защитить животных от заболевания, она не лишена ряда серьёзных недостатков: а) иммунный ответ формируется медленно, и существует риск заражения вирусом вакцинированного животного до развития адаптивного иммунного ответа; б) животные могут стать носителями вируса даже после успешной вакцинации; в) сложно отличить вакцинированных животных от выздоравливающих и инфицированных [3].

Исследователи уже много лет пытаются создать альтернативные вакцины против вируса ящура. В качестве одного из возможных вариантов рассматриваются синтетические пептидные вакцины на основе фрагментов 135-160 и 200-213 белка VP1, содержащих вируснейтрализующие В-эпитопы [119] и фрагментов этого же белка 20-41 и 170-189, содержащих Т-хелперные эпитопы [120, 121]. В Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН была разработана синтетическая пептидная вакцина на основе фрагмента 135-159 белка VP1 штамма А22 вируса ящура, которая обеспечивала защиту от вируса в течение 1 года после однократной иммунизации [121, 122]. Эта вакцина является единственной синтетической пептидной вакциной, разрешённой в России к использованию в ветеринарии [122].



**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** В настоящее время имеются предпосылки для целенаправленного подбора иммуногенов с прицелом на те иммунные процессы, которые должна "запускать" будущая вакцина. Однако пока все известные синтетические пептидные вакцины против возбудителей инфекционных заболеваний человека находятся на различных стадиях клинических испытаний [123]. Такая ситуация связана со следующими обстоятельствами: трудность воспроизведения нативной конформации участков белковых антигенов; некоторые эпитопы В-клеток, распознаваемые нейтрализующими антителами, являются составными, а не линейными; пептиды легко подвергаются протеолизу. Сами по себе пептиды обычно слабо иммуногенны, и для такой вакцины необходим тщательный подбор адъюванта. Разрешённые во всех странах адъюванты – соли и гидроокись алюминия – неэффективны в случае пептидных вакцин, а более эффективные адъюванты для пептидов далеко не везде разрешены к применению на людях (в частности, они запрещены к применению в США [124]). Тем не менее, углубление знаний о структурах антигенов возбудителей инфекционных заболеваний, механизмах формирования иммунного ответа, разработка технологий крупномасштабного синтеза длинных пептидов, получения стабилизированных наночастиц и создание эффективных и малотоксичных адъювантов позволяют надеяться на то, что эффективные пептидные вакцины будут созданы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Makela P.H. (2000) FEMS Microbiol. Rev., **24**, 9-20.
2. Учайкин В.Ф., Шамшьева О.В. (2001) Вакцинопрофилактика. "Гэотар-Мед", М.
3. Barrett A.D.T., Stanberry L.R. (2009) Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases. Elsevier Inc.
4. Livjaqvist S., Stahl S.J. (1999) Biotechnol., **73**, 1-33.
5. Rappuoli R. (2001) Vaccine, **21**, 17-19.
6. Palena C., Abrams S.I., Schlom J., Hodge J.W. (2006) Adv. Cancer. Res., **95**, 115-145.
7. Machiels J.P., van Baren N., Marchand M. (2002) Semin Oncol., **29**, 494-502.
8. Raphaël F., Rousseau M.S., Hirschmann-Jax C., Takahashi S., Brenner M.K. (2001) Hematology/Oncology Clinics of North America, **15**, 741-773.
9. Sesardic D.J. (1993) Med. Microbiol. **39**, 241-242.
10. Bijker M.S., Melief C.J., Offringa R., van der Burg S.H. (2007) Expert Rev. Vaccines, **6**, 591-603.
11. Vogel F.R., Alving C.R. (2002) in: The Jordan Report, 20<sup>th</sup> Anniversary. Accelerated Development of Vaccines (C. Heilman, P. McInnis and S. Landry, eds.), pp. 39-43.
12. Aguilar J.C., Rodríguez E.G. (2007) Vaccine, **25**, 3752-3762.
13. Ben-Yedidia T., Arnon R. (1997) Curr. Opin. Biotechnol., **8**, 442-448.
14. van der Burg S.H., Bijker M.S., Welters M.J., Offringa R., Melief C.J. (2006) Adv. Drug. Deliv. Rev., **58**, 916-930.
15. Sobolev B.N., Olenina L.V., Kolesanova E.F., Poroikov V.V., Archakov A.I. (2005) Curr. Computer-Aided Drug Design, **1**, 207-222.
16. СП 3.3.2.015-94, утвержденные постановлением Госкомсанэпиднадзора России от 12.08.94. (1995) Минздрав России
17. СП 3.3.2.561-96, утвержденные постановлением Госкомсанэпиднадзора России от 31.10.96. (1998) М., Информационно-издательский центр Минздрава России
18. МУК 4.1/4.2.588-96 (1998) М. Информационно-издательский центр Минздрава России

19. *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.* (2000) Иммунология. (Пер. с англ.), Мир, М.
20. *Ярилин А.А.* (1999) Основы иммунологии. Медицина, М.
21. *Barocchi M.A., Censini S., Rappuoli R.*, (2007) *Vaccine*, **25**, 2963-2973.
22. *Klade C.S.*, (2002) *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **4**, 216-23.
23. *Tedeschi G., Taverna F., Negri A., Piccinini R., Nonnis S., Ronchi S., Zecconi A.* (2009) *Vet. Microbiol.*, **134**, 388-391.
24. *Vytvytska O., Nagy E., Blüggel M., Meyer H.E., Kurzbauer R., Huber L.A., Klade C.S.* (2002) *Proteomics*, **2**, 580-590.
25. *Ling E., Feldman G., Portnoi M., Dagan R., Overweg K., Mulholland F., Chalifa-Caspi V., Wells J., Mizrahi-Nebenzahl Y.* (2004) *Clin. Exp. Immunol.*, **138**, 290-298.
26. *Målen H., Søyterland T., Wiker H.G.* (2008) *Scand. J. Immunol.*, **67**, 245-252.
27. *Glowalla E., Tosetti B., Krönke M., Krut O.* (2009) *Infect. Immun.*, **77**, 2719-2729.
28. *Meinke A., Henics T., Hanner M., Minh D.B., Nagy E.* (2005) *Vaccine*, **23**, 2035-2041.
29. *Felgner P.L., Kayala M.A., Vigil A., Burk C., Nakajima-Sasaki R., Pablo J., Molina D.M., Hirst S., Chew J.S.W., Wang D., Tan G., Duffield M., Yang R., Neel J., Chantratita N., Bancroft G., Lertmemongkolchai G., Davies D.H., Baldi P., Peacock S., Titball R.W.* (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 13499-13504.
30. *Giefing C., Meinke A.L., Hanner M., Henics T., Bui M.D., Gelbmann D., Lundberg U., Senn B.M., Schunn M., Habel A., Henriques-Normark B., Ortqvist A., Kalin M., von Gabain A., Nagy E.* (2008) *J. Exp. Med.*, **205**, 117-131.
31. *Rodriguez L.L., Barrera J., Kramer E., Lubroth J., Brown F., Golde W.T.* (2003) *Vaccine*, **21**, 3751-3756.
32. *Haro I., Pérez S., Garsna M., Chan W.C., Ercilla G.* (2003) *FEBS Lett.*, **540**, 133-140.
33. *Соболев Б.Н., Поройков В.В., Оленина Л.В., Колесанова Е.Ф., Арчаков А.И.* (2003) *Биомед. химия*, **49**, 309-332.
34. *Sieker F., May A., Zacharias M.* (2009) *Curr. Protein. Pept. Sci.*, **10**, 286-296.
35. *Wiwanitkit V.* (2009) *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **42**, 19-21.
36. *Wulf M., Hoehn P., Trinder P.* (2009) *Methods Mol. Biol.*, **524**, 361-367.
37. *MacNamara A., Kadolsky U., Bangham C.R., Asquith B.* (2009) *PLoS Comput. Biol.*, **5**(3), e1000327.
38. *Lin H.H., Zhang G.L., Tongchusak S., Reinherz E.L., Brusica V.* (2008) *BMC Bioinformatics*, **12**, Suppl 12:S22.
39. *Perry L.C., Jones T.D., Baker M.P.* (2008) *Drugs R. D.*, **9**, 385-396.
40. *Roggen E.L.* (2006) *J. Immunotoxicol.*, **3**, 137-149.
41. *Tian F., Yang L., Lv F., Yang Q., Zhou P.* (2009) *Amino Acids*, **36**, 535-554.
42. *Schuler M.M., Nastke M.D.* (2007) *Methods Mol. Biol.*, **409**, 75-93.
43. *Castric P.A., Cassels F.J.* (1997) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 56-57.
44. *Кузьмина Т.И., Оленина Л.В., Санжаков М.А., Фарафонова Т.Е., Абрамихина Т.В., Дюбюиссон Ж., Соболев Б.Н., Колесанова Е.Ф.* (2009) *Биомед. химия*, **55**, 32-40.
45. *Olenina L.V., Nikolaeva L.I., Sobolev B.N., Blokhina N.P., Archakov A.I., Kolesanova E.F.* (2002) *J. Viral Hepat.*, **9**, 174-182.
46. *Bongartz J., Bruni N., Or-Guil M.* (2009) Epitope mapping using randomly generated peptide libraries. in: *Epitope Mapping Protocols* (M. Schutkowski and U. Reineke, eds.) Humana Press, pp. 237-246.
47. *Pereboeva L.A., Pereboev A.V., Wang L.F., Morris G.E.* (2000) *J. Med. Virol.*, **60**, 144-151.
48. *Lu X., DeFelippis M.R., Huang L.* (2009) *Anal. Biochem.*, **395**, 100-107.
49. *Ahmed R.K., Maeurer M.J.* (2009) *Methods Mol. Biol.*, **524**, 427-438.
50. *Tribbick G.* (2002) *J. Immunol. Meth.*, **267**, 27-35.
51. *Kalyuzhny A.E.* (2005) *Handbook of ELISPOT. Methods and Protocols.* Humana Press.

52. *Panina-Bordignon P., Tan A., Termijtelen A., Demotz S., Corradin G., Lanzavecchia A.* (1989) *Eur. J. Immunol.*, **19**, 2237-2242.
53. *Jackson D.C., Purcell A.W., Fitzmaurice C.J., Zeng W., Hart D.N.* (2002) *Curr. Drug Targets*, **3**, 175-196.
54. *Bermúdez A., Reyes C., Guzmán F., Vanegas M., Rosas J., Amador R., Rodríguez R., Patarroyo M.A., Patarroyo M.E.* (2007) *Vaccine*, **25**, 4487-4501.
55. *Lauer G.M., Barnes E., Lucas M., Timm J., Ouchi K., Kim A.Y., Day C.L., Robbins G.K., Casson D.R., Reiser M., Dusheiko G., Allen T.M., Chung R.T., Walker B.D., Klennerman P.* (2004) *Gastroenterology*, **27**, 924-936.
56. *Moss C.X., Tree T.I., Watts C.* (2007) *EMBO J.*, **26**, 2137-2147.
57. *Куприянова М.А., Жмак М.Н., Короев Д.О., Чепуркин А.В., Вольпина О.М., Иванов В.Т.* (2000) *Биоорг. химия*, **26**, 926-933.
58. *Tam J.P.* (1988) *Proc. Natl. Acad. USA*, **85**, 5409-5413.
59. *Van Regenmortel M.H., Muller S.* (1999) *Synthetic peptides as antigens*. Amsterdam: Elsevier Science.
60. *Lloyd-Williams P., Albericio F., Giralt E.* (1997) *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*. CRC Press LLC: New York.
61. *Bruckdorfer T., Marder O., Albericio F.* (2004) *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **5**, 29-43.
62. *Mitsuaki N., Shizuko I., Satoshi N., Takuya I.* (1987) *Macromolecules*, **20**, 2306-2307.
63. *Markéta R., Michal L., Milan S.* (1999) *Lett. Peptide Sci.*, **6**, 15-22.
64. *Sabatino G., Papini A.M.* (2008) *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.*, **11**, 762-770.
65. *Freund J.* (1956) *Adv. Tuberc. Res.*, **7**, 50-55.
66. *Roestenberg M., Remarque E., de Jonge E., Hermesen R., Blythman H., Leroy O., Imoukhuede E., Jepsen S., Ofori-Anyinam O., Faber B., Kocken C.H., Arnold M., Walraven V., Teelen K., Roeffen W., de Mast Q., Ballou W.R., Cohen J., Dubois M.C., Ascarateil S., van der Ven A., Thomas A., Sauerwein R.* (2008) *PLoS One*, **3**, 1-12.
67. *Allison A.C., Byars N.E.* (1991) *Mol. Immunol.*, **28**, 279-284.
68. *Kensil C.R.* (1996) *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.*, **13**, 1-55.
69. *Takahashi H., Takeshita T., Morein B., Putney S., Germain R.N., Berzofsky J.A.* (1990) *Nature*, **344**, 873-875.
70. *Kensil C.R., Wu J-Y., Soltysik S.* (1995) In: *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*. New York: Plenum Press., pp. 525-541.
71. *Singh M., Kazzaz J., Ugozzoli M., Malyala P., Chesko J., O'Hagan D.T.* (2006) *Curr. Drug. Deliv.*, **3**, 115-120.
72. *Schlapphoff V., Klade C.S., Jilma B., Jelovcan S.B., Cornberg M., Tauber E., Manns M.P., Wedemeyer H.; IC41 Study Group.* (2007) *Vaccine*, **25**, 6793-6806.
73. *Хаитов Р.М., Пинегин Б.В.* (2003) *Иммунология*, **№3**, 196-202.
74. *Оленина Л.В., Кузьмина Т.И., Кураева Т.Е., Соболев Б.Н., Колесанова Е.Ф., Арчаков А.И.* (2003) *Новости науки и техники. Сер. Медицина. Аллергия, астма и клиническая иммунология*, **9**, 51-53.
75. *Düesberg U., von dem Bussche A., Kirschning C., Miyake K., Sauerbruch T., Spengler U.* (2002) *Immunol. Lett.*, **84**, 89-95.
76. *Chua B.Y., Zeng W., Lau Y.F., Jackson D.C.* (2007) *Vaccine*, **25**, 92-101.
77. *Jackson D.C., Lau Y.F., Le T., Suhrbier A., Deliyannis G., Cheers C.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15440-15445.
78. *Deliyannis G., Kedzierska K., Lau Y.F., Zeng W., Turner S.J., Jackson D.C.* (2006) *Eur. J. Immunol.*, **36**, 770-778.
79. *Zeng W., Ghosh S., Lau Y.F., Brown L.E., Jackson D.C.* (2002) *J. Immunol.*, **169**, 4905-4912.
80. *Muhlradt P.F., Kiess M., Meyer H., Sussmuth R., Jung G.J.* (1997) *Exp. Med.*, **185**, 1951-1958.
81. *Ghosh S., Walker J., Jackson D.C.* (2001) *Immunology*, **104**, 58-66.
82. *Brendon Y., Chua B.Y., Eriksson E.M., Brown L.E., Zeng W., Gowans E.J., Torresi J., Jackson D.C.* (2008) *Vaccine*, **26**, 4866-4875.

83. Zeng W., Jakson D.C., Murray J., Rose K., Brown L.E. (2000) *Vaccine*, **18**, 1031-1039.
84. Wiesmuller K.H., Bessler W.G., Jung G. (1992) *Int. J. Pept. Protein Res.*, **40**, 255-260.
85. Engler O.B., Schwendener R.A., Dai W.J., Wölk B., Pichler W., Moradpour D., Brunner T., Cerny A. (2004) *Vaccine*, **23**, 58-68.
86. Каплун А.П., Ле Банг Шон, Краснопольский Ю.М., Швец В.И. (1999) *Вопр. мед. химии*, **№1**, 3-12.
87. Scheerlinck J.P., Greenwood D.L. (2008) *Drug. Discov. Today*, **13**, 882-887.
88. Scheerlinck J.P., Greenwood D.L. (2006) *Methods.*, **40**, 118-124.
89. Eldrige J.H., Staas J.K., Meulbroek J.A., Tice T.R., Gilley R.M. (1991) *Infect. Immun.*, **59**, 2978-2983.
90. Cox E., Verdonck F., Vanrompay D., Goddeeris B. (2006) *Vet. Res.*, **37**, 511-539.
91. Torresi J., Stock O.M., Fischer A.E., Grollo L., Drummer H., Boo I., Zeng W., Earnest-Silveira L., Jackson D.C. (2007) *Hepatology*, **45**, 911-920.
92. Badell E., Oeuvray C., Moreno A., Soe S., van Rooijen N., Bouzidi A. (2000) *J. Exp. Med.*, **192**, 1653-1660.
93. Guévin C., Lamarre A., Labonté P. (2009) *Antiviral Res.*, **84**, 14-22.
94. Zhu Q., Oei Y., Mendel D.B., Garrett E.N., Patawaran M.B., Hollenbach P.W., Aukerman S.L., Weiner A.J. (2006) *Antimicrob Agents Chemother.*, **50**, 3260-3268.
95. Stamataki Z., Grove J., Balfe P., McKeating J.A. (2008) *Clin. Liver. Dis.*, **12**, 693-712.
96. Epstein J.E., Giersing B., Mullen G., Moorthy V., Richie T.L. (2007) *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **9**, 12-24.
97. Takala S.L., Plowe C.V. (2009) *Parasite Immunol.*, **31**, 560-573.
98. Urdaneta M., Prata A., Struchiner C.J., Tosta C.E., Tauil P., Boulos M. (1998) *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **58**, 378-385.
99. Graves P., Gelband H. (2006) *Cochrane Database Sys. Rev.*, **18**, CD006199.
100. Bouharoun-Tayoun H., Oeuvray C., Lunel F., Druilhe P. (1995) *J. Exp. Med.*, **182**, 409-418.
101. Dodoo D., Theisen M., Kurtzhals J.A., Akanmori B.D., Koram K.A., Jepsen S. (2000) *J. Infect. Dis.*, **181**, 1202-1205.
102. Theisen M., Soe S., Oeuvray C., Thomas A.W., Vuust J., Danielsen S. (1998) *Infect. Immun.*, **66**, 11-17.
103. Theisen M., Dodoo D., Toure-Balde A., Soe S., Corradin G., Koram K.K. (2001) *Infect. Immun.*, **69**, 5223-5229.
104. Soe S., Theisen M., Roussilhon C., Aye K.S., Druilhe P. (2004) *Infect. Immun.*, **72**, 247-252.
105. Druilhe P., Spertini F., Soesoe D., Corradin G., Mejia P., Singh S., Audran R., Bouzidi A., Oeuvray C., Roussilhon C. (2005) *PLoS Med.*, **2**, 1135-1144.
106. Sirima S.B., Tiono A.B., Ouédraogo A., Diarra A., Ouédraogo A.L., Yaro J.B., Ouédraogo E., Gansané A., Bougouma E.C., Konaté A.T., Kaboré Y., Traoré A., Roma C., Soulama I., Luty A.J., Cousens S., Nébié I. (2009) *PLoS One*, **4**, 1-11.
107. <http://www.amanet-trust.org/ext/reports/newsletters/issue23June08.pdf>
108. Okitsu S.L., Silvie O., Westerfeld N., Curcic M., Kammer A.R., Mueller M.S., Sauerwein R.W., Robinson J.A., Genton B., Mazier D., Zurbriggen R., Pluschke G. (2007) *PLoS One*, **2**(12), 1-9.
109. Okitsu S.L., Kienzl U., Moehle K., Silvie O., Peduzzi E., Mueller M.S., Sauerwein R.W., Matile H., Zurbriggen R., Mazier D., Robinson J.A., Pluschke G. (2007) *Chem. Biol.*, **14**, 577-587.
110. Genton B., Pluschke G., Degen L., Kammer A.R., Westerfeld N., Okitsu S.L., Schroller S., Vounatsou P., Mueller M.M., Tanner M., Zurbriggen R. (2007) *PLoS One*, **2**(10), 1-9.
111. Tester I., Smyk-Pearson S., Wang P., Wertheimer A., Yao E., Lewinsohn D.M., Tavis J.E., Rosen H.R. (2005) *J. Exp. Med.*, **201**, 1725-1731.



112. *Post J.J.* (2004) *J. Infect. Dis.*, **189**, 1846-1855.
113. *Lauer G.M., Barnes E., Lucas M., Timm J., Ouchi K., Kim A.Y., Day C.L., Robbins G.K., Casson D.R., Reiser M., Dusheiko G., Allen T.M., Chung R.T., Walker B.D., Klennerman P.* (2004) *Gastroenterology*, **27**, 924-936.
114. *Firbas C., Boehm T., Buerger V., Shuller E., Sabarth N., Jilma B., Klade C.S.* (2010) *Vaccine*, **28**, 2397-2407.
115. *Firbas C., Jilma B., Tauber E., Buerger V., Jelovcan S., Lingnau K.* (2006) *Vaccine*, **24**, 4343-4353.
116. *Manns M.P., Wedemeyer H., Cornberg M.* (2006) *Gut.*, **55**, 1350-1359.
117. <http://www.intercell.com>
118. *Amacker M., Engler O., Kammer A.R., Vadrucchi S., Oberholzer D., Cerny A., Zurbriggen R.* (2005) *Int. Immunol.*, **17**, 695-704.
119. *Strohmaier K., Franze R., Adam K.H.* (1982) *J. Gen. Virol.*, **59**, 295-306.
120. *Collen T., Dimarchi D., Doel T.R.* (1991) *J. Immunol.*, **146**, 749-755.
121. *Volpina O.M., Gelfanov V.M., Gelfanov V.M., Yarov A.V., Surovoy A.Yu., Chepurkin A.V., Ivanov V.T.* (1993) *FEBS Lett.*, **333**, 175-178.
122. *Volpina O.M., Yarov A.V., Zhmak M.N., Kuprianova M.A., Chepurkin A.V., Toloknov A.S., Ivanov V.T.* (1996) *Vaccine*, **14**, 1375-1380.
123. <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=vaccine>
124. <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/VaccineSafety/ucm187810.htm>

Поступила: 09. 02. 2010.

## SYNTHETIC PEPTIDE VACCINES

*A.A. Moysa, E.F. Kolesanova*

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical sciences, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: 8-499-246-33-75; fax: 8-499-245-08-57; e-mail: a.alexandr05@mail.ru

This review considers the stages of the development of synthetic peptide vaccines against infectious agents, novel approaches and technologies employed in this process, including bioinformatics, genomics, proteomics, large-scale peptide synthesis, high-throughput screening methods, the use of transgenic animals for modelling human infections. An important role for the development and selection of efficient adjuvants for peptide immunogens is noted. Examples of synthetic peptide vaccine developments against three infectious diseases (malaria, hepatitis C, and foot-and-mouth disease) are given.

**Key words:** vaccine, peptides, B-epitopes, T-epitopes, immune response, malaria, hepatitis C virus.