

БИОИНФОРМАТИКА

УДК 541.6

©Коллектив авторов

КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИН

Б.Н. Соболев, В.В. Поройков, Л.В. Оленина, Е.Ф. Колесанова, А.И.Арчаков

ГУ НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121,
Москва, Погодинская ул. 10., тел.:(095)246-33-80, факс:(095)245-08-57,
эл.почта:boris@ibmh.msk.su

С развитием методов молекулярной биологии появилась возможность выявлять, изолировать и клонировать биологические макромолекулы с тем, чтобы использовать их как иммуногенные компоненты в вакцинных конструкциях. В наши дни - при наличии большого числа геномных данных и их быстром пополнении - потенциальные иммуногены определяются с помощью методов биоинформатики и протеомных технологий. Создание искусственных вакцин из заранее отобранных молекулярных компонентов стало реальностью. Имеющиеся компьютерные методы позволяют выявить потенциальные иммуногены в геномных последовательностях, предсказать их свойства и клеточную локализацию. Ряд методов служит для предсказания Т- и В-эпитопов, которые могут использоваться как составные части минимальных вакцинных конструкций. Разрабатываются и испытываются разнообразные системы продукции и доставки вакцинных препаратов, включая трансгенные растения, вирусные векторы, бактерии, молекулы ДНК и др. Общедоступные информационные ресурсы по молекулярной иммунологии предоставляют инструментарий для анализа и предсказания антигенных характеристик белковых молекул. Сегодня лишь небольшое число искусственных вакцин разрешено к применению, гораздо больше препаратов проходят доклинические и клинические испытания. Применение компьютерных технологий может существенно снизить временные и материальные затраты при разработке вакцинных конструкций. Не менее важно и то, что эти технологии применяются в исследованиях, направленных на создание более эффективных вакцин.

Ключевые слова: искусственные вакцины, геномные данные, биоинформатика, иммуногенные компоненты, предсказание эпитопов, информационные ресурсы.

ВВЕДЕНИЕ. Противооспенная вакцинация была введена в медицинскую практику около 200 лет назад. Эта процедура получила широкое распространение в европейских странах, но механизмы формирования защитного действия оставались неизвестными. Новые вакцины появились спустя почти столетие. Их создание было связано с развитием микробиологии, выявлением и изучением инфекционных агентов [1].

Традиционно вакцины подразделяют на живые, убитые и субъединичные. В субъединичных вакцинах используют отдельные иммуногенные компоненты микроорганизмов, выделенные химическим путем. Главный вывод, который следует из успешной практики применения субъединичных вакцин, - использование отдельных компонентов микроорганизма может вызвать иммунный

КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИН

ответ, достаточный для предотвращения инфекции [2], и, в то же время, избежать побочных эффектов, связанных с введением целостного патогенного агента. В отличие от живых вакцин, которые могут, в принципе, "вернуться" к исходной вирулентной форме, хорошо очищенные субъединичные вакцины безопасны в плане возникновения инфекции. Однако применение субъединичных вакцин также сопряжено с рядом проблем экономического, технологического, медико-биологического и социального характера [2]:

- Длительное культивирование патогенных бактерий, простейших или вирусов для производства иммуногенных компонентов в промышленных масштабах обходится весьма дорого.

- Большие затраты связаны с очисткой и детоксикацией вакцинных препаратов.

- Почти всегда сохраняется риск, связанный с "утечкой" инфекционного агента.

- Нельзя полностью исключить побочных эффектов.

- В ряде случаев, часто в связи с высокой изменчивостью естественного инфекционного агента, не удается выделить иммуногенный компонент, способный вызвать эффективный иммунный ответ.

С развитием методов молекулярной биологии появилась возможность выявлять, изолировать и клонировать биологические макромолекулы либо их фрагменты, которые могут использоваться в качестве иммуногенных компонентов. Молекулярные конструкции, собранные из таких компонентов, составляют основу **субъединичных вакцин нового поколения**. Они обладают следующими преимуществами:

- Применение относительно дешевых и безопасных технологий при создании и производстве вакцинных препаратов. Так, при производстве вакцин на основе достаточно коротких пептидов (до 30 аминокислотных остатков) целесообразно применять химический синтез [3]. В других случаях используют рекомбинантные продукты, которые можно производить в экономичных системах экспрессии, от бактериальных или вирусных векторов до растений [2].

- Использование минимальных иммуногенных фрагментов и легкость очистки существенно снижают риск возникновения побочных эффектов.

- Возможность разработки препаратов для перорального приема ("съедобных вакцин"). В этом случае иммуноген попадает в организм через "естественные ворота инфекции" - слизистые оболочки, которые обладают хорошо развитой системой иммунного контроля [1, 4]. Кроме того, устраняются все осложнения, связанные с инъекциями. Последние, как известно, все чаще вызывают негативную реакцию со стороны населения развитых стран.

- И, наконец, целенаправленное выявление участков молекул, перспективных для создания вакцинных конструкций, осуществляется в самом начале работы. В связи с быстрым увеличением объема доступной информации о геномах микроорганизмов и разработкой соответствующего аналитического инструментария появилась возможность проводить поиск потенциальных иммуногенных компонентов на основе компьютерного анализа структуры биополимеров, прежде всего их первичной структуры, представленной в виде символьных строк - нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

Предварительный компьютерный анализ (*in silico*) позволяет существенно сузить объем экспериментальных работ и ускорить разработку вакцины. Такой подход, получивший название "обратная вакцинология" (Reverse Vaccinology) [5], призван ускорить этап поиска потенциальных иммуногенов. Созданные затем конструкции должны пройти обязательные стадии экспериментальных и клинических испытаний.

Таким образом, при создании искусственных (синтетических или рекомбинантных) вакцинных конструкций их компоновка осуществляется на основе анализа геномных последовательностей. По этой причине мы считаем

обоснованным термин "компьютерное конструирование вакцин". Речь, конечно же, не идет о создании "*in silico*" конструкции, которую можно было бы сразу же внедрить в медицинскую практику. Каждый этап компьютерного поиска требует экспериментальной проверки, а затем проведения повторного анализа или работы "с нуля". И все же применение вычислительных технологий в молекулярной иммунологии позволяет разрабатывать новые вакцинные препараты на более строгой теоретической основе, что снижает риск получения отрицательных результатов. На данном этапе развития науки уже можно целенаправленно подбирать иммуногены с прицелом на те иммунные процессы (эффекторные механизмы иммунного ответа), которые должна "запускать" будущая вакцина. Искусственные конструкции могут создаваться и в тех случаях, когда вакцина с данной специфичностью уже имеется, но обладает выраженными побочными эффектами, малоэффективна или дорога в производстве.

Примеры искусственных вакцин, получивших разрешение к применению и находящихся на доклинических и клинических испытаниях, приведены в табл. 1.

Таблица 1. Некоторые искусственные (рекомбинантные или пептидные) вакцины на разных этапах разработки и внедрения

Инфекционный агент	Стадия разработки	Литература
Вирус гепатита В	Вакцины разрешены к применению	[6, 7]
<i>Borrelia burgdorferi</i> (болезнь Лайма)	Вакцина была разрешена к применению, но в настоящее время ее поступление на рынок приостановлено в связи с побочными эффектами у некоторых вакцинированных лиц.	[8, 9]
<i>Bordetella pertussis</i> (коклюш)	Вакцина разрешена к применению.	[10]
Вирус гепатита Е	III фаза клинических испытаний	[11]
ВИЧ	I-III фазы клинических испытаний	[12, 13]
Малярийный плазмодий	III Фаза клинических испытаний	[14]
Вирус гриппа	Испытания на животных	[15, 16, 17]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Испытания на животных	[18, 19]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Испытания на животных. Иммунизация добровольцев (I фаза клинических испытаний)*.	[20, 21]
Вирус ящура	Вакцина для животных, разрешенная к применению в РФ	[22]

Примечание: * Защитный эффект полученных антител определялся на мышах

На данный момент лишь немногие искусственные вакцины разрешены к применению, большинство вакцинных препаратов находится на стадии клинических испытаний.

Драматична история с вакциной **LYMErix**, предназначенной для профилактики болезни Лайма. После того как многие люди были вакцинированы против этого заболевания, стали поступать сообщения о побочных эффектах в виде артритических и мышечных болей, а также других симптомов. В отдельных случаях симптоматика имела даже более выраженный характер, чем при болезни Лайма [9]. Напомним, что рекомбинантные вакцины конструируются для того, чтобы как раз минимизировать побочные эффекты. У многих из пострадавших был обнаружен маркер HLA-DR4+, который встречается примерно у трети населения. Повышенной чувствительностью к вакцине обладают и лица, ранее переболевшие болезнью Лайма. В результате спрос на вакцину резко упал, и фирма-изготовитель сняла ее с продажи. Эта поучительная история еще раз продемонстрировала необходимость тщательного испытания новых препаратов. Кроме того, очевидна необходимость развития методик прогноза неблагоприятных побочных эффектов на стадии компьютерного анализа.

1. Эффекторные механизмы иммунного ответа и разработка вакцинных конструкций.

Прежде чем перейти собственно к проблематике, связанной с компьютерным конструированием вакцин, напомним наиболее важные положения, которые следует учитывать при дизайне новых вакцинных препаратов.

Формирование иммунного ответа начинается со связывания антигена В- и Т-лимфоцитами, несущими мембранные белки-рецепторы, которые способны специфически распознавать отдельные участки - антигенные детерминанты или эпитопы чужеродных молекул. Иммуноглобулиновые рецепторы В-лимфоцитов (как и свободные антитела) распознают расположенные на поверхности участки антигена - так называемые В-эпитопы. Рецепторы Т-лимфоцитов взаимодействуют с пептидными фрагментами (Т-эпитопами) антигена, расщепленного в клетке. Т-эпитопы представлены на поверхности клетки, будучи нековалентно связанными с белками МНС (Major Histocompatibility Complex, главный комплекс гистосовместимости). Комплексы МНС класса I связывают фрагменты белков, которые экспрессируются в самой клетке и расщепляются в протеасомах (собственные белки организма, белки вирусов, риккетсий и некоторых бактерий). Комплексы МНС класса II связывают фрагменты антигенов, захваченных антиген-презентирующей клеткой по механизму эндоцитоза и подвергшихся протеолизу в эндолизосомальной системе. Рецепторы Т-клеток связываются с антигенными детерминантами, ассоциированными с МНС, поэтому специфичность этого связывания определяется не только структурой антигенного пептида, но и белками самого МНС. У человека эти белки получили название HLA (Human Leukocyte Antigens, антигены лейкоцитов человека). При взаимодействии Т-лимфоцита с клеткой, презентирующей антиген, происходит стимуляция лимфоцита, которая ведет либо к его гибели, либо к пролиферации соответствующего Т-клеточного клона.

Каждый из классов МНС кодируется группой локусов (генов), представленных множественными аллелями. Этот полиморфизм следует учитывать как при выявлении Т-эпитопов, так и при конструировании вакцин.

Цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) инициируют запуск сложного каскада реакций, приводящих к гибели клеток, несущих соответствующие Т-эпитопы. Большая часть CTL-клеток несет маркер CD8 и взаимодействует с МНС-I, чем и объясняется ключевая роль CTL в устранении клеток, пораженных внутриклеточной инфекцией.

Клетки, распознающие пептиды, ассоциированные с МНС-II или Т-хелперы (Th-лимфоциты), несут маркер CD4. Они разделяются на подгруппы, отличающиеся по набору выделяемых ими цитокинов. Считается, что клетки подтипа Th1 принимают участие в стимуляции цитотоксических реакций, а клетки подтипа Th2 стимулируют продукцию антител. Однако такое разделение не абсолютно.

Представления о механизмах Th-стимуляции антителообразования укладываются в достаточно четкую схему. В-лимфоцит взаимодействует с поверхностным участком этого антигена (В-эпитопом) с помощью своего иммуноглобулинового рецептора. Связанный таким образом антиген подвергается интернализации и протеолизу с последующей презентацией полученных пептидов в составе МНС-II. Th-лимфоциты связываются с В-лимфоцитами, несущими специфичные Т-эпитопы процессированного антигена. Отметим, что В-эпитопы, связываемые рецепторами В-клеток и презентруемые ими Т-эпитопы, как правило, относятся к разным частям антигена. Взаимодействие между Т-хелперами и В-клетками способствует запуску процессов пролиферации В-лимфоцитов. Часть размножающихся В-клеток дает начало плазматическим клеткам, синтезирующим антитела.

Часть Т- и В-лимфоцитов, пролиферирующих после стимуляции, дает начало так называемым клеткам памяти, которые обуславливают более быстрое развитие иммунных реакций при вторичном ответе на соответствующий антиген. Собственно, на этом явлении и основана вакцинация.

Более подробно эта информация изложена в работах [23-25].

Прежде всего, при разработке вакцины нужно определить эффекторные механизмы иммунного ответа, которые должны быть реализованы в ответ на введение препарата. Разные типы вакцинных конструкций индуцируют различные эффекторные механизмы. Синтетические пептиды или рекомбинантные белки вызывают, в основном, ответные реакции В-клеток и Т-клеток CD4+, с возможной Th-стимуляцией гуморального иммунитета. Для индукции цитотоксического иммунитета нужны другие носители - такие как вирусные векторы или ДНК-вакцины. Необходимо принимать в расчет и реакцию организма на адьюванты [4].

Важно учитывать и тип антител, которые индуцируются при данном способе введения. В тех случаях, когда воротами инфекции служат слизистые оболочки (пожалуй, самый распространенный из естественных способов инфицирования), антитела типа IgA играют ведущую роль в реакциях гуморального иммунитета. В связи с этим вполне обоснована разработка вакцинных препаратов, которые могут вводиться *per os* [4].

2. Геномные исследования. Методы биоинформатики в разработке субъединичных вакцин нового поколения.

Определение полных или частичных геномных последовательностей многих бактерий, возбудителей паразитарных инфекций и вирусов открыло прямой путь к применению компьютерных методов в разработке вакцин. При выявлении нового вируса в первую очередь определяют нуклеотидную последовательность его генома. Секвенирование генома уже известного патогенного агента позволяет выявить ранее неизвестные белки и использовать эти сведения при разработке вакцин (рис. 1). Это позволяет провести предварительную идентификацию минимальных иммуногенных компонентов, минуя дорогостоящую и длительную стадию культивирования. Сочетание такого подхода с протеомными технологиями позволяет получить более определенные результаты, а современные методы молекулярного клонирования обеспечивают быструю "наработку" иммуногена с последующей проверкой его антигенных свойств [26].

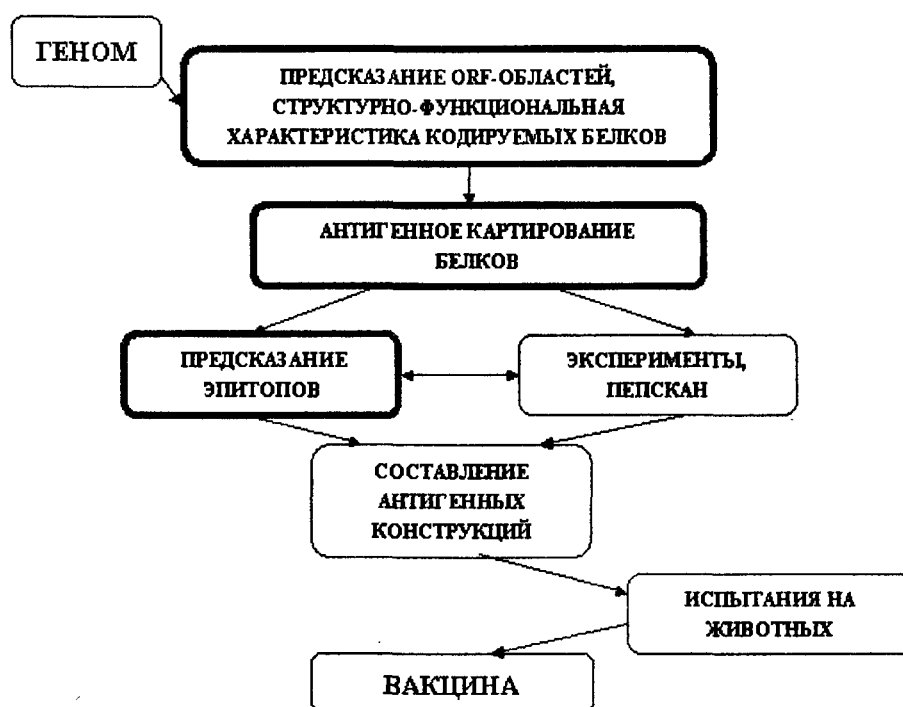


Рисунок 1.

Схема исследований "От генома к вакцине". Блоки, связанные с применением компьютерных методов, обведены двойной линией.

КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИН

В связи с накоплением больших объемов данных о структуре биополимеров были разработаны программные средства для их обработки, хранения и анализа. Они составили основу новой дисциплины - биоинформатики [27].

Методы биоинформатики позволяют:

- Определить потенциальные белок-кодирующие участки в геномных последовательностях и расшифровать аминокислотные последовательности этих белков.
- Предсказать структурно-функциональные характеристики белка, в том числе и его (внутри- или внеклеточную) локализацию. Это важно в том случае, когда белок рассматривается как источник В-эпитопов, способных индуцировать гуморальный ответ.

- Провести сравнительный анализ аминокислотных последовательностей в разных штаммах инфекционного агента для выявления наиболее консервативных по антигенным свойствам белков или их фрагментов. Использование консервативных иммуногенов позволит создать вакцинный препарат, эффективный против всех (или большинства) разновидностей данного микроорганизма или вируса.

- В ряде случаев разработчики отдают предпочтение минимальным конструкциям, составленным из отдельных Т- и В-эпитопов. Подобный подход пытаются применять, в частности, если иммунодоминантные участки поверхностных белков отличаются выраженной изменчивостью и приходится брать за основу менее иммуногенные, но консервативные участки. Он оправдан и в том случае, когда не удастся создать систему с адекватной модификацией экспрессируемого белка. Методы предсказания антигенных участков, связанных с различными механизмами иммунного ответа, описаны ниже.

2.1. Выявление белок-кодирующих участков в геномных последовательностях.

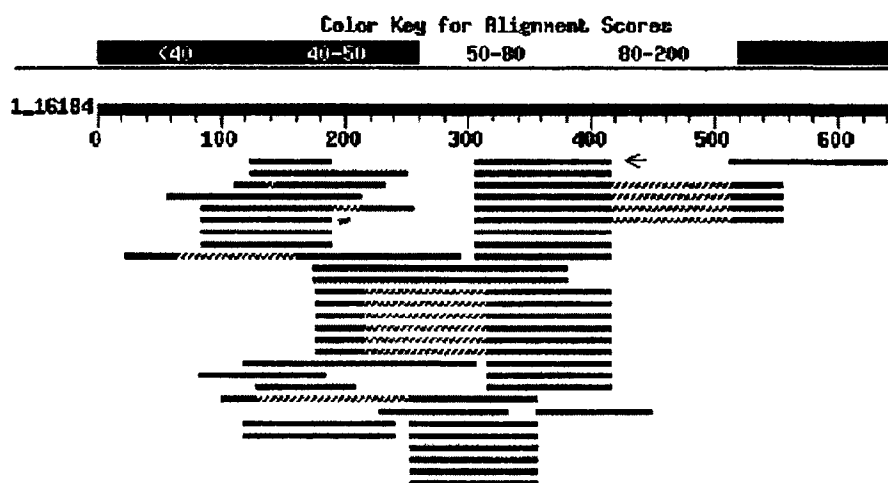
Для идентификации белок-кодирующих участков используют так называемые методы выравнивания (alignment), которые позволяют идентифицировать потенциальные транслируемые белки по сходству с уже известными и охарактеризованными белками. При этой процедуре производят широкомасштабный скрининг баз данных, в ходе которого определяются аминокислотные последовательности, сходные с тестируемой. Сопоставление проводится с помощью различных алгоритмов локального выравнивания. На данный момент наиболее популярны компьютерные программы семейства Blast [28] (рис. 2).

Помимо идентификации белка и его функциональной характеристики, поиск сходства по базам данных имеет еще один аспект. Необходимо убедиться, что выявленный иммуноген не имеет сходства с белками человека. В противном случае, будучи воспринят как собственный антиген, он может не индуцировать иммунный ответ, либо спровоцировать аутоиммунные реакции.

Анализ нуклеотидных последовательностей позволяет выявить открытые рамки считывания и при отсутствии гомологичных аминокислотных последовательностей. Во вновь секвенированном геноме такие "новые" белки могут составлять до 20% от всех рамок считывания. В этом случае новые бактериальные гены могут определяться путем выявления регуляторных участков [26].

2.2. Предсказание структурно-функциональных характеристик белков по аминокислотной последовательности.

Анализ аминокислотных последовательностей, полученных методом "компьютерной трансляции", позволяет предсказывать функции белков патогенного агента. Функция белка определяется при сопоставлении (выравнивании) аминокислотной последовательности исследуемого белка с последовательностями функционально охарактеризованных белков или целыми семействами таких белков. Даже при весьма умеренном уровне сходства участки, окружающие функционально значимые остатки, остаются неизменными. Надежность предсказания может быть увеличена за счет использования шаблонов белковых семейств, которые составляются на основе общего выравнивания целостных гомологичных последовательностей. Такие шаблоны (так называемые профили белковых семейств) содержат вероятностные оценки соответствия



→ Score = 43.7 bits (89), Expect = 0.025
 Identities = 15/37 (40%),
 Positives = 27/37 (72%) Frame = +3 / +2
 Query: 306 GRHLIFCHSKKKCDELATKLSALGLNAVAYRGLDVS 416
 G +++C +++ C++LA +LS+ G+NA AY+ GL S
 Sbjct: 869 GCGIVYCRTREACEQLAIELSSRGVNAKAYHAGLKAS 979

Рисунок 2.

Поиск сходных последовательностей с помощью программы *TblastX* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Программа сопоставляет аминокислотные последовательности, транслированные из геномных данных. На выходе программы - схема расположения сходных участков и соответствующие парные выравнивания (приведенный пример выравнивания соответствует отрезку, помеченному стрелкой).

каждого из 20 аминокислотных остатков с каждой выровненной позицией с учетом возможных вставок и делеций. Коллекции подобных профилей и инструменты поиска профильных соответствий содержатся в информационных ресурсах PFAM [29], SMART [30] и др. База данных PROSITE [31] содержит коллекцию локальных функциональных участков (мотивов) (рис. 3).

a)

{DERK} (6) - [LIVMFWSTAG] (2) - [LIVMFYSTAGCQ] - [AGS] - C

б)

MKKILLTVSLGLALSACATQGTVDKDAQITQDWSVEKLYA
 EAQDELNS SNYTRAVKLYEILES RFP T SRHAQQSQLDTAY
 AYYKDDEKDKALAAIDRFRLHPQH PNM DYALYLRGLVLF
 NEDQSFLNKLASQDWS DRDPKANREAYQAF AELVQRF P NS
 KYAADATARMVKLV DALG GNEMSVARYYMKRGAYIAANR
 AQKIIGSYQNTRYVEESLAILELAYKKLDKPRLAADTRRV
 LETNFPKSPFLKQFWRSDMPFWRYWH

Рисунок 3.

Шаблон PS00855 в базе данных PROSITE [31] (а) и соответствующий участок в липопротеине менингококка В (б). Последовательность, соответствующая шаблону, распознается сигнальной пептидазой II, которая отщепляет сигнальный пептид, предшествующий остатку цистеина. С этим остатком ковалентно связывается жирная кислота [35].

КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИН

Белки внутриклеточных паразитов, синтезируемые пораженной клеткой, рассматриваются как индукторы и мишени цитотоксических реакций. В случае вирусных инфекций это могут быть и неструктурные белки. Поверхностные белки бактерий и вирусов рассматриваются, в первую очередь, как наиболее вероятные мишени нейтрализующих антител. По наличию характерных участков (например, найденных при сопоставлении с шаблонами базы данных PROSITE) и участков со специфическим аминокислотным составом можно с высокой точностью предсказать локализацию белка [32]. Поверхностная локализация наружных белков (мембранных или секретируемых) предсказывается по наличию характерного сигнального пептида, который необходим для переноса пептидной цепи через мембрану (программа SignalP [33, 34]). Помимо этого могут определяться и другие признаки поверхностной локализации. Липопротейны бактерий могут быть распознаны по характерным паттернам прикрепления липидов [35] (рис. 3). Для типичного вирусного гликопротеина характерно наличие гидрофобных кластеров в N-концевой части аминокислотной последовательности, а также потенциальных сайтов N-гликозилирования [36, 37] в наружном домене (рис. 4). Мембранные белки бактерий могут быть структурированы и по другому типу с несколькими мембранными тяжами амфипатического характера (т.е. с чередованием гидрофобных и полярных остатков) и наружными петлями [38]. Существующие методы (такие как программа PHD [39]) позволяют надежно предсказывать локализацию мембранных участков в аминокислотных последовательностях. Для этого также используются расчеты профилей по шкалам гидрофобности [40].

YYSMVGNWAKVLIYMLLFAGVGDGDTHTTGGVAGRDTLRFTGFFSLGPKQK
IQLVNTNGSWHINRTALNCNDSLNTGWLAALFYTHSFNASGCPERMASCH
PIDEFAQGWGPITYAEHSSSDQRPYCWYAPQPCGIVPASEVCGPVYCFY
PSPVVVGTTDRHGVPTYSWGENGTDVLLNNTRPPQGNWFGCTWMNGTGF
TKTCGGPPCNIGGVGNNTLTCPTDCFRKHPEATYTKCGSGPWLTFRCMVD
YPYRLWHYPCTVNFTIFKVRMYVGGVEHRLSAACNWTRGERCDLEDRDS
ELSPLLLSTTEWQVLPCSF~~TT~~LPALSTGLINLHQNIVDVQYLYGIGSVVV
SFAIKWEYVVLLELLLADARVCACLVMMLLIAQAEA

Рисунок 4.

Предсказанные функциональные участки в аминокислотной последовательности гликопротеина E2 вируса гепатита С, которые указывают на его поверхностную локализацию. Сигнальный пептид определен с помощью программы SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalp-2.0/>) [33,34]. Потенциальные сайты гликозилирования (в рамках) расставлены в соответствии с шаблоном PS00001 из базы данных Prosite [31]. Трансмембранная область определена по шкале гидрофобности [40].

При выборе иммуногенных компонентов, следует руководствоваться данными о природе инфекционного агента и об основных эффекторных механизмах иммунного ответа, которые должны инициироваться при вакцинации.

Хорошим примером удачного сочетания экспериментальных и компьютерных методов при разработке вакцинных конструкций может служить разработка вакцины против менингококка группы В [41, 42]. Его капсула содержит такие полисахариды, которые представлены во многих тканях человека. В связи с этим они слабо иммуногенны и, в принципе, могут индуцировать аутоиммунные реакции. Это не позволяет получить субъединичную вакцину наподобие тех, что успешно применяются против менингококков групп А и С. Протективные В-эпитопы были идентифицированы в наружных петлях мембранных белков.

Были получены конструкции, состоящие из везикул наружных мембран со встроенными в них белками менингококка. Разработанные на их основе вакцины дали положительный эффект при клинических испытаниях [43, 44]. Однако, в связи с высокой вариабельностью петлевых участков, выработанный иммунитет ограничивался только конкретными штаммами [45]. В ходе выполнения соответствующего геномного проекта фрагменты нуклеотидных последовательностей менингококка группы В были проанализированы с помощью компьютерных методов. В результате выявлено около 600 гипотетических белков с поверхностной локализацией. 350 белков были клонированы в *E. coli*, очищены и использованы для иммунизации мышей. Индуцированные антитела вызывали опосредованный комплементом лизис бактерий. Некоторые из вновь выделенных белков оказались липопотеинами с консервативными (у различных штаммов) аминокислотными последовательностями [42].

Число расшифрованных геномов патогенных микроорганизмов и вирусов увеличивается быстрыми темпами [46]. Геномные данные используются в исследованиях, направленных на разработку вакцин против вирусных (гепатит С [47]), бактериальных (туберкулез [48, 49], сифилис [50], менингит), паразитарных (малярия [51, 52] и хламидиозных [53, 54]) инфекций.

2.3. Антигенное картирование при разработке вакцинных конструкций

Анализ геномных и кодируемых ими аминокислотных последовательностей позволяет определить потенциальные мишени иммунных реакций. Эти результаты обязательно должны получить экспериментальное подтверждение. Что же делать дальше? Создавать ли систему, экспрессирующую полноразмерный белок, или сосредоточиться на отдельных иммуногенных фрагментах белка?

В первом случае белок должен обладать достаточно консервативной аминокислотной последовательностью, особенно на участках антигенных детерминант (предсказанных или определенных экспериментально). Необходимо подобрать систему экспрессии, которая обеспечит не только правильную пространственную укладку, но и такую же посттрансляционную модификацию белка, как в клетках естественного хозяина. Нельзя не учитывать и экономические соображения, связанные с поддержанием клеточной культуры, производящей рекомбинантный белок, и с очисткой этого белка.

Создание небольших пептидных конструкций может быть экономически выгодно, если трудно подобрать дешевую систему экспрессии с "правильной" модификацией рекомбинантного белка. Возможна ситуация, когда проще поддерживать культуру, воспроизводящую рекомбинантный белок-носитель со вставками иммуногенных участков патогенного агента (не модифицируемых в естественных условиях). В ситуациях со значительной изменчивостью иммунодоминантных эпитопов могут предприниматься попытки создания конструкций на основе консервативных антигенных участков, которые могли бы вызывать защитный ответ.

Даже в том случае, когда удастся успешно реализовать первый подход, весьма полезно провести детальное антигенное картирование и оценить изменчивость/консервативность антигенных детерминант.

Если разрабатываемая вакцина должна вызывать гуморальный ответ, то соответствующая конструкция должна содержать антигенные детерминанты патогенного агента, которые способны индуцировать синтез антител, нейтрализующих возбудитель инфекции. Антигенные детерминанты, связываемые антителами, или В-эпитопы - это участки белковых молекул, доступные для антител. Таким образом, отбираемые для вакцины В-эпитопы должны входить в состав поверхностных белков клетки, и располагаться на поверхности этих белков.

Различают линейные и конформационные В-эпитопы [55]. Линейные эпитопы соответствуют непрерывным участкам аминокислотной последовательности, тогда как конформационные состоят из аминокислотных остатков, сближенных в пространстве, но разделенных в последовательности. Эта

КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИН

терминология достаточно условна, поскольку конформационные характеристики важны для связывания с антителами в обоих случаях. Обычно под линейными В-эпитопами подразумевают такие участки аминокислотной последовательности, которые, будучи использованы в виде отдельных пептидов, способны связываться с антителами к целой молекуле или индуцировать синтез антител, специфичных к данному белку.

Хотя большинство В-эпитопов белковой молекулы представлено конформационными детерминантами, их вычленение из целостной молекулы затруднительно. В связи с этим широко применяется синтез пептидов с последовательностями линейных эпитопов. Существующие в настоящее время алгоритмы предсказания В-эпитопов рассчитаны именно на выявление линейных участков.

2.3.1. Компьютерное предсказание В-эпитопов. Самые простые и наиболее часто применяемые методы основаны на том факте, что разные типы аминокислотных остатков встречаются с разной частотой на поверхности и внутри белковой глобулы. Для предсказания антигенности используют показатели, отражающие физико-химические характеристики отдельных аминокислот. Привлекаются и данные по распределению аминокислотных остатков в расшифрованных трехмерных структурах белков. Для описания свойств аминокислотных остатков создаются шкалы, каждая из которых содержит 20 значений - по одному для каждого аминокислотного остатка. Ниже охарактеризованы некоторые из шкал, которые используются при предсказании В-клеточных эпитопов.

· Гидрофильность/гидрофобность. Шкалы этой группы наиболее популярны. Соответствующие значения рассчитаны на основе экспериментальных данных:

- по определению свободной энергии переноса из воды в этанол [56];
- по определению свободной энергии переноса из органического растворителя в воду [57];
- по поверхностному натяжению растворов аминокислот [58];
- по времени удержания пептидов на обращенно-фазовых носителях при высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (использовались пептиды типа $\text{acetyl-Gly-X-X-(Leu)}_3\text{-(Lys)-amide}$, в которых позиции X были заняты одной из 20 аминокислот) [59].

· Конформационная подвижность (Flexibility). Авторы, предложившие эту шкалу, исходили из связи между подвижностью и антигенностью отдельных сегментов белковой молекулы. Показатели рассчитаны по значениям температурных коэффициентов, определенных для C α -атомов в расшифрованных рентгенографически структурах белков [60].

· Акрофильность (Acrophilicity) [61]. Шкала рассчитана с учетом данных по степени экспонированности остатков различных типов на поверхности 49 белковых молекул с расшифрованной трехмерной структурой.

· Доступность (Accessibility) для молекул растворителя [62]. Шкала рассчитана по 29 белковым структурам. Использовались данные по частоте поверхностной локализации аминокислотных остатков. Поверхностными считали остатки, у которых поверхность, доступная для молекул воды, превышала 20 ангстрем.

· Антигенность (Antigenicity) [63]. Шкала составлена на основе статистического анализа 69 линейных эпитопов, экспериментально определенных в 20 белках. Каждое из двадцати значений рассчитано по частоте встречаемости данного остатка в В-эпитопах, нормированной к ожидаемой частоте.

· Предсказание вторичной структуры. Обычно в этом случае говорят о методах, основанных на статистике встречаемости остатков разных типов в разных элементах вторичной структуры. Исходя из общих принципов строения глобулярных белков, считают, что линейные В-эпитопы должны чаще располагаться на участках β -поворотов или более длинных петель, чем в β -тяжах или α -спиралях. Чаще всего предсказание β -поворотов проводят по методу Chow и Fasman на основе частот встречаемости аминокислотных остатков в каждой из четырех позиций "классического" β -поворота [64].

Заметим, что для выявления потенциальных участков связывания антител используются и другие шкалы. Однако в их основу положены принципы, сходные с теми, что использованы при составлении вышеперечисленных шкал.

Процедура предсказания включает построение профиля (представленного в виде графика) одной из вышеуказанных характеристик. Значения, соответствующие каждому аминокислотному остатку, усредняются по перекрывающимся окнам заданной длины, "скользящим" вдоль последовательности (например, 1-7, 2-8, 3-9 и т.д.). Для большей наглядности полученная кривая "сглаживается". В конечном счете, все перечисленные методы определяют с той или иной вероятностью поверхностные участки белковой молекулы. Они не отличаются высокой надежностью. Самые точные из них выявляют около 65% остатков, действительно расположенных в антигенных детерминантах, определенных экспериментально. Как правило, в компьютерных программах, предназначенных для выявления участков потенциальных эпитопов, используют несколько шкал [65]. Предсказания В-эпитопов обычно проводят до начала антигенного картирования, чтобы исключить из пептидного сканирования (процедуры PEPSCAN [66]) области с минимальными прогностическими оценками - например, гидрофобные участки.

В белковой молекуле области петель, то есть наиболее доступные для антител участки, отличаются повышенной изменчивостью. Однако петли, участвующие в осуществлении функций данного белка, например, в связывании с клеточными рецепторами, как правило, более консервативны. Именно это обстоятельство и позволяет отыскивать достаточно консервативные эпитопы в структуре белков.

Поверхностные участки белковой молекулы гораздо точнее определяются тогда, когда удастся найти белок-гомолог с известной пространственной структурой. Вначале производится выравнивание последовательностей, а затем пептидная цепь моделируемого белка "укладывается" по шаблонной структуре. После этого модель уточняется с помощью методов молекулярной механики и динамики. Таким путем удастся выявить поверхностные участки, включая и петли. Этот подход использован, например, при выявлении антигенных детерминант оболочечного белка вируса японского энцефалита [67]. В качестве шаблона использовалась трехмерная структура оболочечного белка вируса клещевого энцефалита. Конформационные расчеты также применялись для моделирования выбранного эпитопа в составе химерного пептида. Пептид и соответствующий участок целой молекулы хорошо совмещались между собой. Такое воспроизведение исходной конформации в вакцинной конструкции должно обеспечить индукцию антител, специфичных к нативному белку.

2.3.2. Компьютерное предсказание Т-эпитопов Т-эпитопы - это пептидные фрагменты процессированного белка, которые нековалентно связываются с белками комплекса МНС (у человека HLA) и вместе с МНС экспонируются на поверхности клетки. Для их выявления надо определить сайты расщепления исследуемого белка протеазами и в этих предсказанных участках определить аминокислотные позиции, которые контактируют с аминокислотными остатками полости МНС. Пептидный лиганд принимает в полости развернутую конформацию. Немаловажную роль в его связывании с МНС играют водородные связи. Для связывания с полостью МНС важно, чтобы пептидный лиганд соответствовал специфическому позиционному шаблону или мотиву. Такой шаблон составлен из последовательных позиций, для каждой из которых предпочтительны те или иные аминокислотные остатки. Иными словами, каждому из 20 остатков приписываются оценки его встречаемости во всех позициях шаблона. В шаблоне могут быть выделены так называемые якорные позиции, состав которых особенно важен для связывания с полостью МНС [68].

Методы предсказания Т-эпитопов в первую очередь нацелены на выявление мотивов, специфичных для МНС человека (белков HLA). Известно, что

КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИН

структурные характеристики пептидов, связываемых комплексами МНС-I и МНС-II, различны. В то же время, шаблоны связывания МНС-лигандов различны и для молекул МНС одного и того же класса и даже аллельных вариантов одного и того же локуса. Эти различия обусловлены структурными особенностями антигенсвязывающей полости. Для обозначения локусов и аллелей HLA используется международная номенклатура, принятая Всемирной организацией здравоохранения [69].

Комплекс МНС-I образован собственно МНС-белком и β_2 -микроглобулином. При этом антигенсвязывающая полость образована доменами основного белка. Антигенсвязывающая полость комплекса МНС-II образована полипептидными цепями $\alpha\beta$ -димера. Общее строение полости в комплексах обоих типов сходно, однако в МНС-I она сужена с обоих концов, а наиболее устойчивые водородные связи (а значит, и наиболее консервативные якорные позиции) образуются на концах пептида. Полость МНС-II вмещает более длинные пептиды, концы которых выходят за ее пределы, при этом якорные позиции пептида распределены по всей длине полости. В связи с этими структурными различиями становятся понятными и различия в шаблонах пептидов, связываемых разными классами МНС [70].

Типичный лиганд МНС-I (распознаваемый цитотоксическими Т-лимфоцитами CD8+) - это девятичленный пептид, вторая и девятая позиции которого наиболее консервативны. Лиганды МНС-II варьируют по длине в пределах от 12 до 25 остатков, два или четыре остатка располагаются в "боковых карманах" полости.

Каждый локус и аллель характеризуется своим шаблоном, отражающим особенности строения антигенсвязывающей полости и размещение в ней якорных и неякорных остатков. В настоящее время предсказание Т-эпитопов возможно лишь для небольшого числа аллелей. Информация по экспериментально определенным Т-эпитопам хранится в специализированных базах данных, таких как SYFPEITHI [68] и FIMM [71]. Эти сведения используются для уточнения уже составленных или определения новых мотивов. Каждый мотив, специфичный для определенного аллеля HLA, может быть представлен в виде позиционной матрицы, содержащей оценки встречаемости всех 20 остатков в каждой из позиций лиганда. Предсказание цитотоксических эпитопов (лигандов МНС-I) по установленным шаблонам дает весьма надежные результаты - предсказания с наивысшими оценками ("верхушка", составляющая 2% от всех оценок) оказываются правильными более чем в 90% случаев (рис. 5). Для распознавания МНС-лигандов используются и компьютерные нейронные сети [72, 73].

Надежность предсказания эпитопов существенно повышается, если удастся правильно предсказать сайты протеолиза в клетках. Недавно в Интернете представлена программа PAPproC, позволяющая предсказывать сайты расщепления, осуществляемого протеасомными ферментами [74]. Именно эти протеазы обеспечивают первичный процессинг антигенов, фрагменты которых затем связываются с МНС-I. Для определения паттернов расщепления разработана модель на основе искусственной нейронной сети с обучением на экспериментальных данных. Информация о вероятных сайтах расщепления нужна не только для предсказания Т-эпитопов, но и для создания вакцинных конструкций, чтобы обеспечить "естественный" процессинг препарата. При этом надо учитывать, что пептиды, образующиеся при протеасомном расщеплении, подвергаются последующему укорочению с N-конца (т.н. триммингу) под действием пептидаз эндоплазматической сети [75].

Транспорт антигенных пептидов определяется разными механизмами. Для некоторых вариантов HLA преобладает механизм, связанный с транспортным белком TAP, который в данном случае определяет концентрацию загруженных данным пептидом комплексов HLA на поверхности клетки. Поэтому идентификация пептидов, обладающих или не обладающих сродством к TAP, позволяет уточнить предсказание Т-эпитопов, специфичных для определенных

	Позиции шаблона									Название белка
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
"Якорные" остатки		H							L	
	I		E	P	A	V	V	V	F	
Преобладающие остатки	Y		A	D	G	I	R	R	M	
	T		S	E	P	M	P	E		
	G			G	N	K		T		
	E			K		R		A		
				Q						
				V						
Известные Т-эпитопы	G	H	D	P	R	A	Q	G	T	L
	D	H	C	V	A	H	K	L		
	I	H	E	D	S	T	N	R	R	L
	E	H	A	H	N	M	R	V	M	
	G	H	L	E	N	N	P	A	L	
	H	H	S	G	A	K	V	V	L	
	I	H	D	P	G	R	G	A	P	L
	T	H	T	Q	P	G	V	Q	L	
	T	H	Y	V	A	P	R	R	L	
	Y	H	G	H	G	V	S	A	F	
	Y	Q	E	K	G	V	R	V	L	
	I	H	E	P	E	P	H	I	L	
	A	H	S	T	I	M	P	R	L	
	E	H	A	G	V	I	S	V	L	
										HLA-DP a chain(220-229)
										Cytochrome C reductase (66-73)
										Heat shock protein 90 b (440-450)
										Elongation factor 2 (489-497)
										60 S acidic rib. protein PQ (67-75)
										Chaperonin cont. TCP-1 h (282-290)
										60 S ribosomal protein L8 (49-58)
										Septin 2 homologue (70-78)
										Transcription activator SNF2L4 (899-907)
										Human EST
										Actin-related protein Arp2 (402-410)
										Cyclin-dep. kin. reg. subunit 1 (59-67)
										DNA repl. lic. factor MCM4 (694-702)
										HBV X interacting protein (40-48)

Рисунок 5.

Пептидный мотив лиганда HLA-B*1510 (MHC-I) и естественные Т-эпитопы с этой специфичностью. Дано по [68], с изменениями.

аллелей HLA. Для идентификации TAP-связываемых пептидов предложено использовать компьютерные нейронные сети [76]. Другая группа авторов также предоставляет инструментарий для выявления пептидов, обладающих высокой степенью сродства к TAP, на сервере JenPer [77] (см. табл. 2).

До недавнего времени предсказания эпитопов, связываемых с комплексом MHC-II, были не столь успешны. Недавно в открытом доступе был выставлен программный пакет EPIREDICT [78], который позволяет с достаточно высокой надежностью предсказывать Th-эпитопы, специфичные для некоторых аллелей HLA-II. И в этом случае алгоритм построен на использовании позиционных матриц встречаемости аминокислотных остатков.

Адреса информационных ресурсов в Интернете, содержащих программы по предсказанию Т-эпитопов, приведены в табл. 2.

При реализации рассмотренных подходов предсказание Т-эпитопов с данной аллельной специфичностью зависит от наличия и представительности набора пептидов, который используется для расчета позиционной матрицы или обучения компьютерной нейронной сети. Такие наборы собраны далеко не для всех аллелей, что и накладывает ограничения на применение методов данной группы [79].

Другая группа методов основана на исследовании трехмерной структуры комплексов "MHC-пептид". Таким путем удастся точнее локализовать позиции пептида, ответственные за связывание с комплексом. В комплексе MHC выделяют шесть "карманов", в которых могут размещаться боковые цепи аминокислотных остатков связываемого пептида. Положение этих "карманов" остается постоянным в различных вариантах MHC, однако изменяются их физико-химические свойства, обуславливая тем самым аллельную специфичность. Эта особенность строения

КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИН

Таблица 2. Информационные ресурсы по Т-эпитолам и лигандам МНС.

Название и краткая характеристика	Электронный адрес
HLA-Peptide Ligands. Web-страница со ссылками на наиболее популярные ресурсы по пептидным лигандам HLA.	http://www.ihwg.org/components/peptider.htm
PROREDICT. Сервер, предназначенный для предсказания лигандов МНС-II.	http://www.imtech.res.in/raghava/propred/index.html
EPIREDICT. Пакет программ для предсказания Т-эпитопов и лигандов МНС-II	http://www.epipredict.de/index.html
EPIMATRIX. Сайт, предоставляющий услуги по выявлению Т-эпитопов на коммерческой основе.	http://www.epivax.com/epimatrix.html
SYFPEITHI База данных по лигандам МНС и пептидным мотивам Т-эпитопов с инструментарием для предсказания	http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/
FIMM: база данных по Т-эпитолам с инструментами для поиска и анализа.	http://sdmc.krdl.org.sg:8080/fimm/
МНСРЕР. База данных по Т-эпитолам	http://wehih.wehi.edu.au/mhcpep/
BIMAS. Программа предсказания потенциальных пептидных фрагментов, связываемых МНС-I человека.	
VACCNOME Сайт некоммерческой организации, предоставляющей программу TERITORE для предсказания Т-клеточных эпитопов	http://www.vaccinome.com/
PAPROC. Программа предсказания сайтов расщепления в протеосомах.	http://www.paproc.de/
МНС-Peptide (MPID). База данных содержит сведения по трехмерным структурам комплексов "МНС-пептид" в формате PDB	http://surya.bic.nus.edu.sg/mpid/intro.html
JenPep. База данных, представляющая количественные данные по функциональным характеристикам пептидов, связываемых МНС	http://www.jenner.ac.uk/JenPep/
МНС-Tools. Коллекция данных по структурам МНС со ссылками на сайты с близкой тематикой	http://web.mit.edu/stern/www/mhctools.htm

используется для моделирования комплекса "МНС-пептид" по гомологии. Полипептидные цепи белка МНС и лиганда как бы укладываются по трехмерному шаблону, построенному по расшифрованной пространственной структуре. Таким способом можно получить лишь приближенную модель. Программа EpiDock [79], предназначенная для выявления лигандов МНС-I, уточняет модель путем минимизации оценочной функции свободной энергии Fresno (Free Energy Scoring Function) [80]. Скорость вычислений достаточна для поиска потенциальных эпитопов в полных геномных последовательностях (расчет проводится для всех 8- 9- и 10-членных пептидов, перекрывающих аминокислотные последовательности, кодируемые данным геномом). С помощью программы EpiDock авторы провели поиск по геномной последовательности вируса гепатита В на наличие потенциальных Т-эпитопов, специфичных к аллелю HLA-A*0201. Они выявили 92% всех известных пептидов, обладающих высокой степенью сродства к данному комплексу HLA и 80% известных Т-эпитопов с данной аллельной специфичностью [79]. Описанный подход может применяться и для предсказания эпитопов с еще не установленным мотивом, только по последовательности аллеля МНС.

3. Использование протеомных методов для идентификации потенциальных антигенов.

С помощью протеомных технологий можно исследовать набор белков, экспрессируемый конкретным микроорганизмом. Основные экспериментальные

методы протеомики - это двумерный электрофорез и масс-спектрометрия продуктов протеолитического расщепления. Компьютерная обработка данных позволяет вычленить пептидные "отпечатки" (fingerprints), представляющие отдельные белки [81]. Сочетание протеомных методов с иммуноблоттингом позволяет выявить антигены, связывающиеся специфическими антителами. Этот подход применен, в частности, при поиске белков, пригодных для создания вакцины против *Helicobacter pylori* [82,83].

4. Создание конструкций и выбор носителя.

Отобранные иммуногенные компоненты могут быть использованы при конструировании вакцин. При этом важно понять, какие механизмы иммунного ответа обуславливают эффективную защиту и, следовательно, должны индуцироваться новой вакциной. Это определит такие взаимосвязанные характеристики, как состав конструкции, способы ее производства и доставки. Поэтому в данном разделе, наряду с компьютерными методиками, обсуждаются и подходы, используемые при экспериментальной разработке вакцинных препаратов.

4.1. Минимальные вакцинные конструкции.

Из вышеизложенного видно, что компьютерные методы позволяют выделить в аминокислотных последовательностях пептидные фрагменты, наиболее перспективные для конструирования вакцин. При создании вакцин исходят из того, что препарат должен обеспечивать индукцию гуморального или клеточного иммунитета, либо обоих компонентов иммунного ответа. Следовательно, минимальная вакцинная конструкция должна содержать В-эпитопы и/или цитотоксические (CTL) эпитопы, а также Т-хелперные (Th) эпитопы - для поддержания индукции гуморального или клеточного ответа. Участки, несущие Т-эпитопы, должны содержать сайты расщепления протеасомными (для CTL-эпитопов) или лизосомальными (для Th-эпитопов) протеазами. Впрочем, наличие сайтов лизосомального протеолиза необязательно при использовании небольших пептидных конструкций.

При выборе Т-эпитопов необходимо учитывать популяционные различия, которые отмечаются при анализе распространенности различных вариантов аллелей HLA [84].

Особая проблема связана с выбором Т-хелперных участков. Экспериментальное подтверждение предсказаний требует временных и финансовых затрат. Поэтому при создании вакцинных конструкций предлагают использовать уже известные Th-эпитопы из других микроорганизмов [85, 86]. При этом предпочтительнее использовать так называемые универсальные, или "неразборчивые" (promiscuous) Т-эпитопы, которые обладают сродством к нескольким наиболее распространенным в данной популяции аллелям HLA (табл. 3). Они обеспечивают поддержку при индукции первичного иммунного ответа. При использовании этого приема исходят из предположения, что клетки памяти, сформировавшиеся вследствие вакцинации, обеспечат эффективный вторичный ответ на естественный патогенный агент даже без специфичной хелперной поддержки. Возможно, в этом случае поддержка обеспечивается за счет узкоспецифичных Th-эпитопов инфекционного агента, которые связываются с Т-клетками, активированными широкоспецифичным эпитопом вакцинной конструкции.

Общие принципы создания вакцинных конструкций отрабатываются в экспериментальных моделях на животных. При этом для тестирования реакций клеточного иммунитета используются трансгенные животные, экспрессирующие HLA-белки человека [91, 92].

Уже после экспериментального подтверждения иммуногенности предсказанных эпитопов методы биоинформатики могут использоваться для планирования экспериментов по изменению антигенных свойств этих участков. Экспериментальные результаты свидетельствуют о возможности усиления иммуногенности CTL-эпитопа при помощи направленных точечных мутаций [93]. Кроме того, в ходе исследований можно изменять взаимное расположение

КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИН

Таблица 3 Примеры универсальных Th-эпитопов.

Исходный белок	Пептид	Лит-ра	Специфичность*
Столбнячный токсин	QYIKANSKFIGITE	[87]	DR1, DRw15(2), DRw18(3), DR4Dw4, DRw11(5), DRw13(w6), DR7, DRw8, DR9, DRw52a, DRw52b
Белок Pfg27 <i>Plasmodium falciparum</i> (стадия полового размножения)	IDVVDSYIIPALPVTDP	[88]	DR15 (DRB1*1503), DR17 (DRB1*03011), DR18 (DRB1*03), DR51 (DRB5*0101), DR52 (DRB3*0101/DRB3*02)
Поверхностный белок (PvMSP-1) мерозонта <i>Plasmodium vivax</i>	LEYLREKAKMAGTLIPE S	[89]	DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*1101, DRB1*0101.
Белок <i>mce2</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	PRYISLIPVNVVAD	[90]	DRB1*0101 (DR1), DRB1*1501 (DR2), DRB1*0301 (DR3), DRB1*0401 (DR4), DRB1*1101 (DR5), DRB1*0701 (DR7), DRB1*0801 (DR8)
Белок <i>mce2</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	VATRAGLVMEAGGSKVT	[90]	DRB1*0101 (DR1), DRB1*1501 (DR2), DRB1*0401 (DR4), DRB1*1101 (DR5), DRB1*0701 (DR7)

Примечание: * Обозначения вариантов HLA даны по цитируемой литературе.

иммуногенных участков для подбора наиболее эффективных образцов. Очень важно правильно выбрать средства доставки антигенного материала, которые обеспечивают запуск нужных механизмов гуморального и клеточного иммунитета.

4.2. Перспективы применения минимальных конструкций при высокой изменчивости инфекционных агентов.

Высокая антигенная изменчивость - одно из основных препятствий к созданию эффективных вакцин против значительного числа микроорганизмов и вирусов на основе живых культур или полноразмерных рекомбинантных белков. Особенно остро эта проблема возникает в случае с инфекциями, которые вызываются вирусами, содержащими небольшой набор белков. В этом случае трудно подобрать такие белки, которые можно было бы использовать как целостные иммуногены, не меняющие антигенных свойств. К инфекционным агентам, постоянно меняющим антигенные свойства, относятся вирус гриппа, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гепатита С (ВГС) и др. Современная техника секвенирования позволяет накапливать большие наборы гомологичных аминокислотных последовательностей различных вариантов одного и того же инфекционного агента. Ясно, что высокая антигенная изменчивость связана в первую очередь с изменчивостью аминокислотной последовательности. Более того, именно те участки белковых молекул, которые несут иммунодоминантные эпитопы и способны индуцировать эффективный вируснейтрализующий ответ, обладают наибольшей изменчивостью. Таким путем инфекционные агенты уходят от иммунного пресса. В первую очередь адаптивная вариативность была показана для участков, содержащих В-эпитопы. Области цитотоксических Т-эпитопов также проявляют некоторую, хотя и не столь выраженную изменчивость. В качестве примера можно указать гипервариабельные участки HVR1 и HVR2 в оболочечном белке E2 вируса гепатита С [94] и участок V3 в оболочечном белке gp120 вируса иммунодефицита

человека [95]. Даже в организме одного пациента вирус гепатита С (ВГС) представлен многими вариантами - так называемыми квазивидами. При этом в ходе инфекции состав выявленных квазивидов и их относительная представительность меняется. В опытах на шимпанзе иммунизация пептидом с последовательностью HVR1 индуцировала эффективную защиту, но только от данного варианта вируса [96].

Применение живых вакцин в данном случае не представляется возможным. Использование векторов, экспрессирующих целые оболочечные белки, не устраняет проблемы антигенной изменчивости. По этой причине усилия исследователей сосредоточились на двух направлениях. Первое направление - поиск консервативных иммуногенных фрагментов в антигенах. Даже в весьма изменчивых оболочечных белках вируса гепатита С удается определить консервативные участки, несущие В-эпитопы [97, 98] (рис. 6). Дальнейшая задача заключается в создании конструкции, которая бы индуцировала протективный ответ на антигенные детерминанты, не являющиеся иммунодоминантными при естественной инфекции. Второй подход заключается в составлении набора эпитопов, которые бы вызвали протективный ответ к большинству вариантов вируса за счет перекрестного иммунитета. По-видимому, второй путь менее реалистичен - по крайней мере, для таких инфекций как гепатит С. По нашим данным число известных вариантов HVR1 на данный момент составляет около 1500.

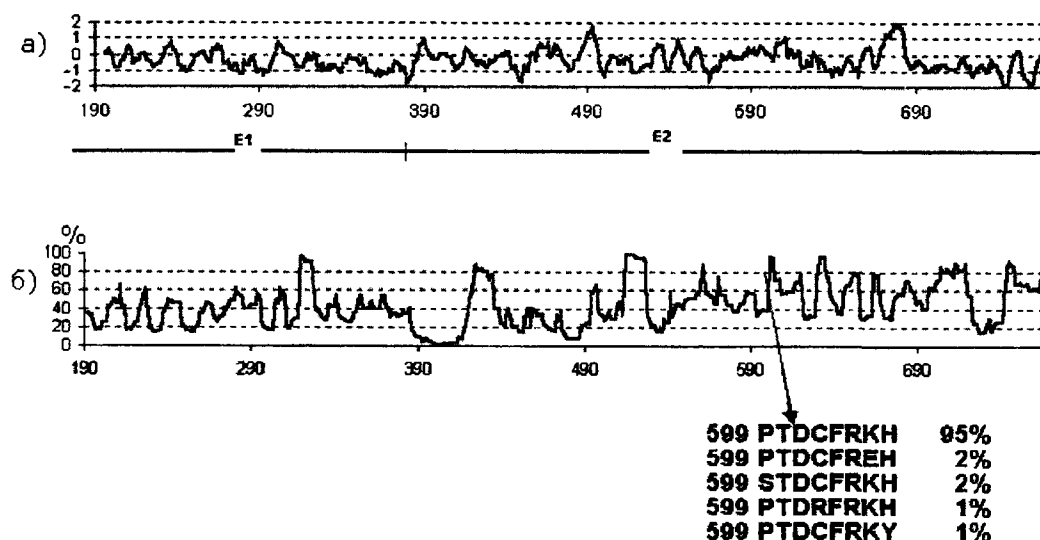


Рисунок 6.

Отбор консервативных участков в аминокислотных последовательностях разных вариантов вируса гепатита С - белки E1 и E2. (а) Профиль гидрофильности, рассчитанный для выровненных последовательностей по шкале Hopp & Woods [56]. (б) Консервативность (частота встречаемости преобладающих октапептидов) в выровненных последовательностях. Для примера показаны пептиды, представляющие один выровненный участок.

Таким образом, анализ аминокислотных последовательностей позволяет выявить вариабельные и консервативные участки, проследить развитие изменений в ходе инфекции, составить представление об изменчивости тех или иных участков белковых молекул.

4.3. Синтетические пептидные вакцины.

В настоящее время пептиды и полипептидные вакцины, полученные путем химического синтеза, применяются в виде экспериментальных вакцин. Единственный препарат на пептидной основе, прошедший широкомасштабные испытания, - вакцина против малярии [14, 99]. Принцип дизайна пептидных

КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИН

вакцин, направленных на формирование антителозависимого иммунного ответа, заключается в компоновке В- и Т-хелперных эпитопов в составе одной молекулы. Такие синтетические пептидные иммуногенные конструкции могут представлять собой линейные олигопептиды, разветвленные дендримеры (в основном так называемые лизиновые "деревья"), олигомеры с боковыми функциональными группами, модифицированными пептидами, а также полимеры, полученные полимеризацией модифицированных пептидов-антигенов или их сополимеризацией с другими соединениями, например, акриламидом. В- и Т-эпитопы в таких конструкциях могут следовать в составе одного олигопептидного звена друг за другом либо присоединяться по отдельности к ветвям дендримера или к функциональным группам олиго- и полимеров [85, 100]. Влияние взаиморасположения В- и Т-эпитопов в этой молекуле на эффективность и специфичность иммунного ответа обычно определяется экспериментально. Однако специалист по биоинформатике мог бы дать некоторые рекомендации по расположению В- и Т-эпитопов, в частности, касающиеся возможностей расщепления катепсином D в фаголизосомах, - с учетом расположения предсказанных элементов регулярной вторичной структуры.

Пептиды, идентифицированные как иммуногены, способны вызвать выраженный иммунный ответ, если они вводятся вместе с носителем или адъювантом. Часто молекулы соединений, обладающих адъювантными свойствами, включают в состав пептидных конструкций. Обычно в качестве таких "внутренних" адъювантов используют производные длинноцепочечных жирных кислот или многозарядные полимеры [85]. Разработкой пептидных иммуногенных конструкций занимается большое число исследовательских групп. Здесь мы упомянем один из отечественных научных коллективов, успешно работающих в данном направлении [101, 102].

4.4. Рекомбинантные антигены.

4.4.1. *Выработка рекомбинантных антигенов в живых системах и средства доставки.* Методы генной инженерии позволяют создавать живые системы, производящие необходимые белки-антигены [2]. Из используемых организмов-хозяев наибольшую экономическую эффективность обеспечивают бактерии, дрожжи и растения. Выбор определяется не только экономическими соображениями, но и тем, насколько необходима посттрансляционная модификация белка для сохранения естественных антигенных свойств.

Для экспрессии рекомбинантных белков широко используются плазмиды, конструирование которых также осуществляется с привлечением компьютерных методов. Рекомбинантная последовательность может представлять полноразмерный белок или некую искусственную конструкцию "минимального" типа. Для индукции гуморального ответа используются микроорганизмы, экспрессирующие поверхностные белки со встроенными антигенными участками (например, *E. coli*, лактобактерии [2]). Атенуированные штаммы сальмонелл, способные к внутриклеточному размножению, могут применяться как векторы для создания конструкций, индуцирующих как клеточный цитотоксический ответ, так и гуморальный ответ [2, 103, 104]. Конструкции на основе вирусных векторов используются для выработки цитотоксических реакций [2].

Внутриклеточная экспрессия антигена достигается и при ДНК-вакцинации, когда основу препарата составляют не белковые продукты, а сами кодирующие последовательности [105]. Препарат, содержащий плазмиду, может вводиться внутримышечно или подкожно. В качестве средств доставки могут использоваться и бактерии, способные проникать в клетки слизистых оболочек кишечника или дыхательных путей.

Весьма привлекательной представляется разработка растительных вакцин. При этом система производства и доставки вакцинного материала объединены в одном и том же съедобном растении. Несколько съедобных растительных вакцин уже прошли через определенные стадии клинических испытаний (табл. 4).

Таблица 4. Примеры разработок растительных вакцин.

Инфекционный агент	Растения, используемые в качестве носителей	Полученный эффект, стадия испытаний	Лит-ра
Токсигенные штаммы <i>E. coli</i>	Кукуруза	Защитный иммунный ответ при скормливания животным	[106]
	Картофель	Защитный иммунный ответ у животных при скормливания; I/II стадия клинических испытаний	[107, 108, 109]
	Табак	Иммунный ответ у животных	[107]
Холерный вибрион	Картофель	Защитный иммунный ответ при скормливания животным	[110]
Вирус гепатита В	Картофель	Иммунный ответ у животных при скормливания I Стадия клинических испытаний	[111, 112]
Вирус Norwalk (гастроэнтерит)	Картофель	I Стадия клинических испытаний	[112]
ВИЧ	Кукуруза	Экспрессия оболочечного гликопротеина gp120	[112]
Цитомегаловирус	Табак	Тестирование антигенных свойств <i>in vitro</i>	[113]
Вирус папилломы человека	Картофель, экспрессирующий вирусоподобные частицы	Испытания на животных	[114]

Однако при непосредственном приеме свежих трансгенных овощей или фруктов невозможно угадать дозу антигена, которая меняется "от растения к растению и от поля к полю". Впрочем, существующие технологические приемы позволяют получать из растений лиофилизированные препараты с точной дозировкой антигена [115]. Но есть и более серьезное препятствие. Известно, что иммунная система кишечника отвечает на прием большинства пищевых антигенов развитием иммунологической толерантности, что позволяет беспрепятственно усваивать пищевые продукты [116]. Таким образом, пероральный прием вакцинного препарата может вызвать совсем не тот эффект, которого добиваются разработчики. С другой стороны, этот механизм может быть использован при лечении некоторых заболеваний, например, хронического гепатита В. В последнем случае поражение печени обусловлено иммунными реакциями на гепатоциты, экспрессирующие вирусные антигены. Показано, что пероральный прием белков вируса гепатита В вызывает подавление иммунного ответа у экспериментальных животных [117].

Не все антигены, поступающие в кишечник, воспринимаются организмом как пищевые компоненты. Так, бактериальные токсины, которые связываются с эпителиальными клетками, или бактерии, реплицирующиеся в клетках слизистой кишечника, вызывают развитие иммунного ответа, а не толерантности [116]. Развитие толерантности зависит от дозировки, частоты приема и особенностей конкретного антигена. В связи с этим необходимы специальные протоколы для тестирования съедобных вакцин [118].

5. Информационные ресурсы, используемые при конструировании вакцин.

В табл. 5 представлены наиболее популярные информационные ресурсы, которые могут быть использованы при конструировании вакцин, базы данных (группа ресурсов IMGT), содержащие сведения о структуре генов и белков, участвующих в работе иммунной системы - HLA-локусов, Т-клеточных

КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИН

рецепторов, иммуноглобулинов и т.д. Информационные ресурсы по геномам микроорганизмов содержат не только наборы данных, но и средства для поиска гомологии (чаще всего Blast).

Таблица 5. Информационные ресурсы по вакцинологии и молекулярной иммунологии.

Название и краткая характеристика	Электронный адрес
Номенклатура HLA. Интерактивная справочная система	http://www.anthonynolan.com/HIG/index.html
CMR (Comprehensive Microbial Resource). Полная база данных по бактериальным геномам	http://www.tigr.org/CMR
IMGT. Международный ресурс по иммуногенетике.	http://imgt.cnusc.fr:8104/
The Vaccine Page: Vaccine News & DataBase. База данных по вакцинам.	http://vaccines.org/
HCVMAP. База данных по антигенному картированию белков вируса гепатита С.	http://www.ibmh.msk.su/hcvmap/
HIV Molecular Immunology. Коллекция информационных ресурсов по молекулярной иммунологии ВИЧ	http://hiv-web.lanl.gov/content/immunology/

Для того чтобы эффективно обрабатывать связанные наборы разнородных данных, относящихся к конкретным микроорганизмам, необходимо сохранять их в структурированной форме. Эта задача облегчается благодаря развитию информационных технологий, которые позволяют достаточно быстро проектировать базы данных. В последние годы стали появляться специализированные ресурсы по ВИЧ, вирусу гепатита С (см. табл. 5) а также другим вирусам и бактериям. Они позволяют представить функциональные, в том числе антигенные участки и оценить их изменения в различных штаммах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В связи с успехами вакцинации в сочетании со значительным улучшением санитарно-гигиенических условий многие традиционные инфекции отступили на задний план, а ряд особо опасных инфекций, в частности, оспа или полиомиелит, считаются практически побежденными. В то же время до сих пор нет действенных вакцин против малярии и других паразитарных инфекций. Кроме того, в последней четверти XX столетия на сцену вышли новые инфекционные агенты, отличающиеся высокой антигенной изменчивостью (вирус иммунодефицита человека, вирус гепатита С и др.). Появились и новые варианты давно известных инфекционных агентов, в частности *M. tuberculosis* [119], что является еще одним свидетельством непрекращающейся эволюции микроорганизмов.

Ожидается, что в новом столетии человечеству придется бороться как с новыми вариантами уже известных вирусов или микроорганизмов, так и с еще не выявленными инфекционными агентами (последний пример - появление атипичной пневмонии). Нельзя не учитывать и возможность злонамеренного использования биологических материалов в целях террора. Вполне возможна ситуация, когда традиционные методики не позволят быстро и своевременно создать действенную вакцину. Новые подходы требуются и в такой принципиально новой области, как создание терапевтических, в первую очередь противораковых вакцин [120-123].

Биоинформатика, геномика и протеомика предоставляют принципиально новые возможности для выявления потенциальных иммуногенных компонентов и создания субъединичных вакцин нового поколения. При этом не следует забывать и об опасностях, связанных с неполнотой наших нынешних представлений о тонкой регуляции иммунного ответа. В то же время, более глубокое понимание молекулярных основ иммунитета может быть достигнуто на основе интегративной компьютерной биологии. Таким образом, развитие вычислительных методов необходимо как для теоретических изысканий в

молекулярной иммунологии, так и для практических приложений. В связи со сказанным ясно, что геномные и протеомные данные, а также соответствующие компьютерные методы будут все больше и больше использоваться при создании вакцинных препаратов, несмотря на многочисленные "подводные камни", которые будут встречаться на этом новом и многообещающем направлении.

Мы приносим благодарность М.А. Эльдарову за предоставленные литературные источники и ценные советы при написании обзора.

Настоящий обзор подготовлен при поддержке Межведомственной программы "Вакцины нового поколения и диагностические системы будущего".

ЛИТЕРАТУРА

1. Makela P.H. (2000) FEMS Microbiol. Rev., **24**, 9-20.
2. Liljeqvist S., Stahl S. J. (1999) Biotechnol., **73**, 1-33.
3. Ben-Yedidia T., Arnon R. (1997) Curr. Opin. Biotechnol., **8**, 442-448.
4. Rappuoli R., Guidice G. del (1999) In: Vaccine. From Concept to Clinic, CRC Press LLC, Boca Raton, Boston, London, New York, Washington DC, pp.5-17.
5. Rappuoli R. (2000) Curr. Opin. Microbiol. **3**, 445-450.
6. Andre F.E. (1990) Vaccine, **8 Suppl**, S74-78.
7. Kao J.H., Chen D.S. (2002) Lancet Infect. Dis., **2**, 395-403.
8. Parenti D. (1999) Conn. Med., **63**, 570.
9. <http://www.lymesite.com/vaccine.htm>
10. Greco D., Salmaso S., Mastrantonio P., et al. (1966) N. Engl. J. Med., **334**, 341-348.
11. Hyams KC. (2002) Curr. Gastroenterol. Rep., **4**, 302-307.
12. Schults A.M., Bradac J.A. (2001) AIDS, **15**, (Suppl 5), S147-158.
13. Mooij P., Heeney J.L. (2001) Vaccine, **20**, 304-321.
14. Migasena S., Heppner D.G., Kyle D.E., et al. (1997) Acta Trop., **67**, 215-227.
15. Kandel R., Hartshorn KL. (2001) BioDrugs, **15**, 303-323.
16. Jackson D., Cadman A., Zurcher T., Barclay W.S. (2002) J. Virol., **76**, 11744-11747.
17. Jeon S.H., Ben-Yedidia T., Arnon R. (2002) Vaccine, **20**, 2772-2780.
18. Agger E.M., Andersen P. (2002) Vaccine, **21**, 7-14.
19. Doherty T.M., Olsen A.W., van Pinxteren L., Andersen P. (2002) Infect. Immun., **70**, 3111-3121.
20. Gor D.O., Ding X., Li Q., Schreiber J.R., et al. (2002) Infect Immun., **70**, 5589-5595.
21. Briles D.E., Hollingshead S.K., King J. et al. (2000) J. Infect. Dis., **182**, 1694-1701.
22. Volpina O.M., Yarov A.V., Zhmak M.N. et al. (1996) Vaccine, **14**, 1375-1380.
23. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. (2000) Иммунология, Мир, М.
24. Игнатов П.Е. (2002) Иммунитет и инфекция, Время, Москва.
25. Ярилин А.А. (1999) Основы иммунологии, Медицина, Москва.
26. Grandi G. (2001) Trends Biotechnol., **19**, 181-188.
27. Mount D.W. (2001) Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
28. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A. et al. (1997) Nucleic Acids Res., **25**, 3389-3402.
29. Bateman A., Birney E., Cerruti L. et al. (2002) Nucleic Acids Res., **30**, 276-280.
30. Letunic I., Goodstadt L., Dickens N.J. et al. (2002) Nucleic Acids Res., **30**, 242-244.
31. Falquet L., Pagni M., Bucher P. et al. (2002) Nucleic Acids Res., **30**, 235-238.
32. Berthet F.X., Coche T., Vinals C. (2001) J. Biotechnol., **85**, 213-226.
33. Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S., von Heijne G. (1997) Protein Eng., **10**, 1-6.

КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИН

34. *Nielsen H, Brunak S, von Heijne G.* (1999) *Protein Eng.*, **12**, 3-9.
35. *Hayashi S., Wu H.C.* (1990) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **22**, 451-471.
36. *Gavel Y., von Heijne G.* (1990) *Protein Eng.*, **3**, 433-442.
37. *Yan B., Zhang W., Ding J., Gao P. J.* (1999) *Protein Chem.*, **18**, 511-521.
38. *Ley P van der, Heckels J.E., Virji M. et al.* (1991) *Infect. Immun.*, **59**, 2963-2971.
39. *Rost B.* (1996) *Methods Enzymol.*, **266**, 525-539.
40. *Kyte, J., Doolittle, R.* (1982) *J. Mol. Biol.*, **157**, 105-132
41. *Tettelin H., Saunders N.J., Heidelberg J. et al.* (2000) *Science*, **287**, 1809-1815.
42. *Pizza M., Scarlato V., Masignani V. et al.* (2000) *Science*, **287**, 1816-1820.
43. *Drabick J.J., Brandt B.L., Moran E.E. et al.* (1999) *Vaccine*, **18**, 160-172.
44. *Katial R.K., Brandt BL, Moran E.E. et al.* (2002) *Infect. Immun.*, **70**, 702-707.
45. *Poolman J.T., Kriz-Kuzemenska P, Ashton F. et al.* (1995) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **2**, 69-72.
46. *Peterson J.D., Umayam L.A., Dickinson T. et al.* (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**, 123-125.
47. *Roccasecca R., Folgori A., Ercole B.B. et al.* (2001) *Int. Rev. Immunol.*, **20**, 289-300.
48. *Montgomery D.L.* (2000) *Brief Bioinform.*, **1**, 289-296.
49. *Louise R., Skjot V., Agger E.M., Andersen P.* (2001) *Scand. J. Infect. Dis.*, **33**, 643-647.
50. *Pennisi E.* (1998) *Science*, **281**, 324-325.
51. *Wang R., Doolan D.L., Le T.P. et al.* (1998) *Science*, **282**, 476-480.
52. *Hoffman S.L., Rogers W.O., Carucci D.J., Venter J.C.* (1998) *Nat. Med.*, **4**, 1351-1353.
53. *Stephens R.S.* (2000) *J. Infect. Dis.*, **181** (Suppl 3), S521-523.
54. *Igietseme J U., Black C.M., Caldwell H.D.* (2002) *BioDrugs.*, **16**, 19-35.
55. *Pellequer J.-L., Westhof E., van Regenmortel M.H.V.* (1994) In: *Peptide antigens. A practical approach*, IRL PRESS, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, pp.7-25.
56. *Hopp, T.P., Woods, K.R.* (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3824-3828.
57. *Nozaki Y, Tanford C.* (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 2211-2227.
58. *Bull H.B., Breese K.* (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* **161**, 665-670.
59. *Parker J.M., Guo D., Hodges R.S.* (1986) *Biochemistry*, **25**, 5425-5432.
60. *Karplus P.A., Schulz G.E.* (1985) *Naturwissenschaften*, **72**, S. 212.
61. *Hopp T.P.* (1984) *Ann. Sclavo. Collana. Monogr.*, **1**, 47-60.
62. *Lee B., Richards F.M.* (1971) *J. Mol. Biol.*, **171**, 479.
63. *Welling G.W., Weijer W.J, van der Zee R., Welling-Wester S.* (1985) *FEBS Lett.*, **188**, 215-218.
64. *Chou P.Y., Fasman G.D.* (1979) *Biophys. J.*, **26**, 367-373.
65. *Odorico M., Pellequer J.-L.* (2003) *J. Mol. Recognit.*, **16**, 20-22.
66. *Carter J.M.* (1994) *Methods Mol. Biol.*, **36**, 207-223.
67. *Kolaskar AS, Kulkarni-Kale U.* (1999) *Virology*, **261**, 31-42.
68. *Rammensee H., Bachmann J., Emmerich N.P. et al.* (1999) *Immunogenetics*, **50**, 213-219.
69. *Albert E.D., Bodmer W.F., Bontrop R.E. et al.* (2002) *Tissue Antigens*, **60**, 407-464.
70. *Dafforn T. R., Lesk A.M.* (2000) In: *Protein-Protein Recognition*, Oxford University Press, Oxford, pp.163-188.
71. *Schonbach C., Koh J.L., Flower D.R. et al.* (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 226-229.
72. *Honeyman M.C., Brusica V., Stone N.L., Harrison L.C.* (1998) *Nat. Biotechnol.*, **16**, 966-969.
73. *Brusica V., Rudy G., Honeyman G. et al.* (1998) *Bioinformatics*, **14**, 121-130.
74. *Nussbaum A.K., Kuttler C., Haderer K.P. et al.* (2001) *Immunogenetics*, **53**, 87-94.

КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИН

34. *Nielsen H, Brunak S, von Heijne G.* (1999) *Protein Eng.*, **12**, 3-9.
35. *Hayashi S., Wu H.C.* (1990) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **22**, 451-471.
36. *Gavel Y., von Heijne G.* (1990) *Protein Eng.*, **3**, 433-442.
37. *Yan B., Zhang W., Ding J., Gao P. J.* (1999) *Protein Chem.*, **18**, 511-521.
38. *Ley P. van der, Heckels J.E., Virji M. et al.* (1991) *Infect. Immun.*, **59**, 2963-2971.
39. *Rost B.* (1996) *Methods Enzymol.*, **266**, 525-539.
40. *Kyte, J., Doolittle, R.* (1982) *J. Mol. Biol.*, **157**, 105-132.
41. *Tettelin H., Saunders N.J., Heidelberg J. et al.* (2000) *Science*, **287**, 1809-1815.
42. *Pizza M., Scarlato V., Masignani V. et al.* (2000) *Science*, **287**, 1816-1820.
43. *Drabick J.J., Brandt B.L., Moran E.E. et al.* (1999) *Vaccine*, **18**, 160-172.
44. *Katial R.K., Brandt B.L., Moran E.E. et al.* (2002) *Infect. Immun.*, **70**, 702-707.
45. *Poolman J.T., Kriz-Kuzemenska P, Ashton F. et al.* (1995) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **2**, 69-72.
46. *Peterson J.D., Umayam L.A., Dickinson T. et al.* (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**, 123-125.
47. *Roccasecca R., Folgori A., Ercole B.B. et al.* (2001) *Int. Rev. Immunol.*, **20**, 289-300.
48. *Montgomery D.L.* (2000) *Brief Bioinform.*, **1**, 289-296.
49. *Louise R., Skjot V., Agger E.M., Andersen P.* (2001) *Scand. J. Infect. Dis.*, **33**, 643-647.
50. *Pennisi E.* (1998) *Science*, **281**, 324-325.
51. *Wang R., Doolan D.L., Le T.P. et al.* (1998) *Science*, **282**, 476-480.
52. *Hoffman S.L., Rogers W.O., Carucci D.J., Venter J.C.* (1998) *Nat. Med.*, **4**, 1351-1353.
53. *Stephens R.S.* (2000) *J. Infect. Dis.*, **181** (Suppl 3), S521-523.
54. *Igietseme J.U., Black C.M., Caldwell H.D.* (2002) *BioDrugs.*, **16**, 19-35.
55. *Pellequer J.-L., Westhof E., van Regenmortel M.H.V.* (1994) In: *Peptide antigens. A practical approach*, IRL PRESS, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, pp.7-25.
56. *Hopp, T.P., Woods, K.R.* (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3824-3828.
57. *Nozaki Y, Tanford C.* (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 2211-2227.
58. *Bull H.B., Breese K.* (1974) *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**, 665-670.
59. *Parker J.M., Guo D., Hodges R.S.* (1986) *Biochemistry*, **25**, 5425-5432.
60. *Karplus P.A., Schulz G.E.* (1985) *Naturwissenschaften*, **72**, S. 212.
61. *Hopp T.P.* (1984) *Ann. Sclavo. Collana. Monogr.*, **1**, 47-60.
62. *Lee B., Richards F.M.* (1971) *J. Mol. Biol.*, **171**, 479.
63. *Welling G.W., Weijer W.J, van der Zee R., Welling-Wester S.* (1985) *FEBS Lett.*, **188**, 215-218.
64. *Chou P.Y., Fasman G.D.* (1979) *Biophys. J.*, **26**, 367-373.
65. *Odorico M., Pellequer J.-L.* (2003) *J. Mol. Recognit.*, **16**, 20-22.
66. *Carter J.M.* (1994) *Methods Mol. Biol.*, **36**, 207-223.
67. *Kolaskar AS, Kulkarni-Kale U.* (1999) *Virology*, **261**, 31-42.
68. *Rammensee H., Bachmann J., Emmerich N.P. et al.* (1999) *Immunogenetics*, **50**, 213-219.
69. *Albert E.D., Bodmer W.F., Bontrop R.E. et al.* (2002) *Tissue Antigens*, **60**, 407-464.
70. *Dafforn T. R., Lesk A.M.* (2000) In: *Protein-Protein Recognition*, Oxford University Press, Oxford, pp.163-188.
71. *Schonbach C., Koh J.L., Flower D.R. et al.* (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 226-229.
72. *Honeyman M.C., Brusica V., Stone N.L., Harrison L.C.* (1998) *Nat. Biotechnol.*, **16**, 966-969.
73. *Brusica V., Rudy G., Honeyman G. et al.* (1998) *Bioinformatics*, **14**, 121-130.
74. *Nussbaum A.K., Kuttler C., Haderer K.P. et al.* (2001) *Immunogenetics*, **53**, 87-94.

75. Stoltze L., Schirle M., Schwarz G. et al. (2000) *Nat. Immunol.*, **1**, 413-418.
76. Brusic V., van Endert P., Zeleznikow J. et al. (1999) *In Silico Biol.*, **1**, 109-121.
77. Blythe M.J., Doytchinova I.A., Flower D.R. (2002) *Bioinformatics*, **18**, 434-439.
78. Jung G., Fleckenstein B., von der Mulbe F. et al. (2001) *Biologicals*, **29**, 179-181.
79. Logean A., Rognan D. J (2002) *Comput. Aided Mol. Des.*, **16**, 229-243.
80. Rognan D., Lauemoller S.L., Holm A. et al. (1999) *J. Med. Chem.*, **42**, 4650-4658.
81. Говорун В.М., Арчаков А.И. (2002) *Биохимия*, **67**, 1341-1359.
82. McAtee C.P., Lim M.Y., Fung K. et al. (1998) *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **714**, 325-333.
83. Ut M., Nilsson I., Ljungh A., Wadstrom T. (2002) *J. Immunol. Methods.*, **259**, 1-10.
84. Bodmer J. (1996) *Ciba Found Symp.*, **197**, 233-253.
85. Jackson D.C., Purcell A.W., Fitzmaurice C.J. et al. (2002) *Curr. Drug Targets.*, **3**, 175-196.
86. Lairmore M.D., DiGeorge A.M., Conrad S.F. et al. (1995) *J. Virol.*, **69**, 6077-6089.
87. Panina-Bordignon P., Tan A., Termijtelen A. et al. (1989) *Eur. J. Immunol.*, **19**, 2237-2242.
88. Contreras C.E., Ploton I.N., Siliciano R.F. et al. (1998) *Infect. Immun.*, **66**, 3579-3590.
89. Caro-Aguilar I., Rodriguez A., Calvo-Calle J.M. et al. (2002) *Infect. Immun.*, **70**, 3479-3492.
90. Panigada M., Sturniolo T., Besozzi G. et al. (2002) *Infect. Immun.*, **70**, 79-85.
91. Taneja V., David C.S. (1998) *J Clin. Invest.*, **101**, 921-926.
92. Taneja V., David C.S. (1999) *Immunol. Rev.*, **169**, 67-79.
93. Sarobe P., Pendleton C.D., Akatsuka T. et al. *J. Clin. Invest.*, **102**, 1239-1248.
94. Kato N., Ootsuyama Y., Tanaka T. et al. (1992) *Virus Res.*, **22**, 107-123.
95. Hoffman N.G. Seillier-Moisewitsch F., Ahn J. et al. (2002) *J. Virol.*, **76**, 3852-3864.
96. Farci P., Shimoda A., Wong D. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15394-15399.
97. Соболев Б.Н., Поройков В.В., Оленина Л.В. и др. (2002) *Биофизика*, **47**(2), 204-210.
98. Olenina L.V., Nikolaeva L.I., Sobolev B.N. et al. (2002) *J. Viral. Hepat.*, **9**, 174-182.
99. Patarroyo G., Franco L., Amador R. et al. (1992) *Vaccine*, **10**, 175-178.
100. Tam J.P. (1994) In: *Peptide Antigens. A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, pp.83-115.
101. Короев Д.О., Обозная М.Б., Жмак М.Н. и соавт. (2002) *Биоорган. химия*, **28**, 291-297.
102. Волкова Т.Д., Вольпина О.М., Жмак М.Н. и соавт. (2001) *Биоорган. химия*, **27**, 174-179.
103. Карпенко Л.И. Игнатъев Г.М., Агафонов А.П. и соавт. (2002) *Вопросы вирусологии*, **47**, 25-28.
104. Бондаренко В.М., Белявская В.А. Воробьев А.А. (2002) *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, № 3, 70-79.
105. Gregersen J.P. (2001) *Naturwissenschaften*, **88**, 504-513.
106. Streatfield S.J., Lane J.R., Brooks C.A. et al. (2003) *Vaccine*, **30**, 812-815.
107. Haq T.A., Mason H.S., Clements J.D., Arntzen C.J. (1995) *Science*, **268**, 714-716.
108. Mason H.S., Haq T.A., Clements J.D., Arntzen C.J. (1998) *Vaccine*, **16**, 1336-1343.
109. Tacket C.O., Mason H.S., Losonsky G. et al. (1998) *Nat. Med.*, **4**, 607-609.
110. Arakawa T., Chong D.K., Langridge W.H. (1998) *Nat. Biotechnol.*, **16**, 292-297.

КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИН

111. Richter L.J., Thanavala Y., Arntzen C.J., Mason H.S. (2000) *Nat. Biotechnol.*, **18**, 1167-1171.
112. Pharmaprojects 2002, PJB Publications Ltd.
113. Tackaberry E.S., Dudani A.K., Prior F. et al. (1999) *Vaccine*, **17**, 3020-3029.
114. Clough J. (2002) *Drug Discov. Today*, **7**, 886-887.
115. Bonetta L. (2002) *Nat. Med.*, **8**, 94.
116. Strober W., Kelsall B., March T. J. (1998) *Clin. Immunol.*, **18**, 1-30.
117. Gotsman I., Alper R., Klein A. et al. (2002) *Cancer*, **94**, 406-414.
118. Tacket C.O., Mason H.S. (1999) *Microbes Infect.*, **1**, 777-783.
119. Kato-Maeda M., Bifani P.J., Kreiswirth B.N., Small P.M. (2001) *J. Clin. Invest.*, **107**, 533-537.
120. Lollini P.L., Forni G. (2003) *Trends Immunol.*, **24**, 62-66.
121. Davis I.D., Jefford M., Parente P., Cebon J. (2003) *J. Leukoc. Biol.*, **73**, 3-29.
122. Meng W.S., Butterfield L.H. (2002) *Pharm. Res.*, **19**, 926-932.
123. Espinoza-Delgado I. (2002) *Oncologist*, **7** (Suppl. 3), 20-33.

Поступила 07.04.03

COMPUTER-AIDED DESIGN OF VACCINES

B.N. Sobolev, V.V. Poroikov, L.V. Olenina, E.F. Kolesanova, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry Rus. Acad. Med. Sci., 10, Pogodinskaya str., Moscow, 119121, Russia; fax: (095) 2450857; e-mail: boris@ibmh.msk.su

With the modern molecular biology techniques, it has been possible to detect, isolate and clone biological macromolecules, which could be used as immunogenes in artificial vaccine constructs. In the post-genomic era, the prospective immunogenic components are searched using bioinformatic tools and proteomic technologies. Today it is quite realistic to combine the artificial vaccine constructs from the preselected molecular components. Existing computational methods are able to detect the potential immunogenes in genomic sequences, predict their characteristics and subcellular location. The set of methods is designed to predict the T- and B-epitopes that can be used as components of minimal vaccine constructs. The variety of systems for production and delivery of vaccines are developed and tested. These include transgenic plants, bacterial and viral vectors, DNA molecules etc. Several informational resources provide free access to molecular immunology data and deliver services on prediction of antigenic features. Several artificial vaccines have already been launched, but much more preparations are under preclinical and clinical trials. Computer-aided design of vaccines may significantly decrease time and costs required for their development. Modern bioinformatic technologies are now employed for discovery of more effective and potent vaccine.

Key words: artificial vaccines, genomic data, bioinformatics, immunogenes, epitope prediction, informational resources.