

*А.А.Воробьев¹, Н.Б.Егорова², Н.С.Захарова², Е.А.Курбатова², Б.Ф.Семенов², А.Л.Гинцбург³,
Б.С.Народицкий³, И.Б.Семенова³, В.В.Зверев⁴, М.В.Киселевский⁵*

Прогноз в области создания вакцин нового поколения для вакцинопрофилактики и вакцинотерапии инфекционных и неинфекционных болезней

1 — Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии ММА им. И.М.Сеченова МЗ и СР РФ;

2 — Институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова РАМН;

3 — Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи РАМН;

4 — Институт вирусных препаратов им. О.Г.Анджапаридзе РАМН;

5 — Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва

*A.A.Vorobyev, N.B.Egorova, N.S.Zakharova, E.A.Kurbatova, B.F.Semenov, A.L.Gintsburg, B.S.Naroditsky,
I.B.Semenova, V.V.Zverev, M.V.Kiselevsky*

Prognosis of development of future vaccine generations for prevention and therapy of infectious and non-infectious diseases

Введение

В настоящее время международные эксперты и правительства большинства стран рассматривают вакцинопрофилактику как наиболее доступный и экономически эффективный способ снижения детской смертности, увеличения ожидаемой продолжительности жизни и достижения активного долголетия во всех социальных группах развитых и развивающихся стран.

В 1998 г. в России принят Федеральный закон "Об иммунопрофилактике инфекционных болезней", в котором устанавливаются правовые основы государственной политики в области иммунопрофилактики инфекционных болезней, осуществляемой в целях охраны здоровья и обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации.

Ниже приводятся данные, свидетельствующие о том, что в ближайшее 10-летие будет существенно расширена сфера применения вакцин. Это расширение произойдет в нескольких направлениях за счет: 1) сохранения и расширения прививок в рамках национальных календарей; 2) создания вакцин для предупреждения новых и возвращающихся инфекций, а также для защиты от бактериологических актов; 3) разработки препаратов для иммунопрофилактики и иммунотерапии онкологических заболеваний; 4) создания средств для иммунологической защиты и лечения наркозависимости и курения; 5) конструирования вакцин, предупреждающих и нормализующих болезни иммунной системы (аллергия, аутоиммунные процессы); 6) увеличения удель-

ного веса терапевтических вакцин, применяемых в рамках комплексного лечения хронических болезней разной этиологии; 7) применения вакцин для профилактики соматических заболеваний (инсулинозависимый диабет, миокардит, атеросклероз, инфаркт и т. д.).

Для решения перечисленных задач будут использоваться достижения геномики и протеомики с учетом новых идей иммунологии, связанных с признанием ведущей роли в создании защиты от патогена системы врожденного иммунитета (*innate immunity*).

В обзоре рассмотрены также пути преодоления противоречия между высокой социальной эффективностью вакцин и низкой рентабельностью производства этих препаратов.

Факторы, стимулирующие развитие рынка вакцин. Возникающие проблемы

Высокая эффективность. Ожидаемое расширение календаря прививок

К 2000 г. стало очевидно, что массовая вакцинация (охват 95 % детей первых лет жизни) приводит в развитых странах к ликвидации полиомиелита (Россия, 1997) и снижению заболеваемости корью, коклюшем, столбняком на 95–98 % по сравнению с довакцинным периодом. По данным ВОЗ, в начале XXI в. в 102 странах не регистрировали или регистрировали только единичные случаи дифтерии.

Прогнозируется, что в национальный календарь прививок 2025 г. войдут вакцины для детей (23) и взрослых (3). Дети получают защиту от гепатита А, В, С; респираторно-синцитиального вируса, вируса парагриппа 1–3-го типов, аденовирусов типа 1, 2, 5–7, менингококков типа А, В, С, пневмококков, полиомиелита, гемофильной инфекции, ротавирусов, кори, паротита, краснухи, ветряной оспы, болезни Лайма, цитомегаловируса, вирусов Эпштейна–Барр, папилломы человека, простого герпеса типа 2, парвовируса и, возможно, против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Для взрослых планируется использование инактивированной гриппозной вакцины, пневмококковой вакцины и вакцины против вируса ветряной оспы (профилактика опоясывающего лишая, актуального в старших возрастных группах).

Большинство вакцин, планируемых для применения в 2025 г., уже созданы и производятся. На стадии разработки находятся вакцины против гепатита С, ВИЧ-инфекции, менингококка типа В и некоторые др.

Вакцинозависимость

Мировой опыт, в т. ч. и опыт России, свидетельствует о том, что современное общество стало вакцинозависимым и для поддержания эпидемиологического благополучия необходима вакцинация 95 % детей даже тогда, когда предупреждаемая инфекция не регистрируется или регистрируются спорадические случаи. Прекращение вакцинации неминуемо ведет к развитию эпидемии. Возврат коклюша наблюдали в Японии, дифтерии — в России, полиомиелита — на Гаити, в Нидерландах, Югославии, Азербайджане и других странах СНГ, кори — в Колумбии и Венесуэле. Даже ликвидация инфекции, например полиомиелита, в масштабе страны и континента не приведет к прекращению прививок. Предсказывается, что после глобального искоренения полиомиелита постликвидационный период, когда продолжится массовое применение вакцины, продлится 10 лет.

Сказанное означает, что ожидаемый эпидемиологический эффект вакцинации (снижение заболевания или ликвидация инфекции) не приведет в обозримом будущем к свертыванию рынка вакцин.

Появление новых или возвращение старых инфекций. Опасность биотеррористических актов

В современном обществе защита от биологической опасности, под которой прежде всего подразумевается опасность инфекций, рассматривается как одна из актуальных задач государственной политики развитых стран, в т. ч. и России.

Обсуждаются 3 наиболее вероятные источника опасности: 1) природные резервуары; 2) биотерроризм; 3) деятельность человека, связанная с вакцинопрофилактикой.

В течение 1972–2003 гг. в человеческую популяцию были занесены 40 ранее неизвестных патогенов, среди которых оказались представляющие серьезную опасность для человека ВИЧ, вирус гепатита В и С. Большую тревогу вызвало появление возбудителя тяжелого острого респираторного синдрома. Предсказывается, что появления новых патогенов следует ожидать и в будущем. Так, недавно (в 2001 г.) в Голландии изолировали человеческий вирус метапневмонии, который в настоящее время обнаруживается по всему Земному шару как возбудитель тяжелой острой инфекции респираторного тракта у детей, пожилых лиц и людей со вторичными иммунодефицитами.

В феврале 2003 г. ВОЗ объявила об угрозе пандемии гриппа. Прогнозируются 2 варианта развития событий. Возвращение подтипа, несущего гемагглютинины H2, или распространение возбудителя с подтипом гемагглютинина, с которым человечество не сталкивалось. В 1-м случае в группу риска войдут все лица моложе 35 лет (они составят примерно 50 % населения); во 2-м к пандемическому вирусу окажется восприимчивым все население Земли.

В качестве кандидата в пандемический вирус называют обнаруженный в 1997 г. подтип вируса птичьего гриппа (H5N1), который до этого времени был неизвестен. Кандидат обладает 2 из 3 свойств, необходимых для превращения в пандемический вариант. Он способен проникать в организм человека и вызывать у него заболевание. Как только кандидат приобретет способность передаваться от человека человеку, начнется пандемия.

В последние годы стало очевидным, что с успехом применяемая для ликвидации полиомиелита живая вакцина Сэбина может быть источником т. н. вакцинных дериватов полиовируса, которые вызывают типичные для дикого вируса параличи и являются причиной единичных и групповых заболеваний. Такие заболевания зарегистрированы уже в 10 странах, включая Россию.

Потенциальная опасность паралитогенных дериватов вакцинных штаммов будет возрастать по мере сокращения циркуляции диких штаммов под влиянием вакцинации. Поэтому ставится задача прекратить использование живой полиомиелитной вакцины, применять для поддержания коллективного иммунитета в постликвидационном периоде инактивированную вакцину, которая, как ожидается, вытеснит из популяции штаммы Сэбина и их паралитогенные дериваты.

О возможности использовать микроорганизмы в качестве биологического оружия террористами заговорили после 11 сентября 2001 г.

Существует несколько списков микроорганизмов, квалифицированных как вероятное биологическое оружие. Первые места в этих списках занимает вирус натуральной оспы и возбудитель сибирской язвы.

Международные эксперты признают, что живая вакцина, с помощью которой элиминировали оспу

на Земле, не может использоваться для защиты современного общества от этого возбудителя, если он будет использован террористами. Применению осповакцины препятствуют высокий риск осложнений у привитых и опасность передачи штамма лицам с нарушениями функции иммунной системы или поражениями кожных покровов, что ведет к развитию генерализованной инфекции и распространенной инфекции кожных покровов. В 2002 г. в США выявили 20 млн человек с противопоказаниями к прививке осповакцины.

Признается актуальным создание нового варианта живой оспенной вакцины с ограниченной способностью размножаться в организме или реанимация проведенных в СССР работ по конструированию пероральной оспенной вакцины. В качестве радикального решения проблемы безопасности предлагается разработать технологии получения вакцин и создать запасы вакцин против всех известных или вновь появляющихся микроорганизмов, даже против тех, которые в настоящее время не представляют опасности, поскольку любой из них при определенных условиях может превратиться в глобальную угрозу (ожидаемую — вирус птичьего гриппа, или реальную — коронавирус, возбудитель тяжелого острого респираторного синдрома). Очевидно, что решение указанной задачи произойдет в далеком будущем.

Возможность использования вакцин для профилактики некоторых соматических и онкологических болезней, а также наркозависимости

В последние годы доказано, что ряд соматических и онкологических заболеваний ассоциированы с патогенными для человека микроорганизмами. В сезонный подъем гриппа возрастают показатели госпитализации и летальности в связи с инфарктами. Участие вируса паротита и краснухи в развитии инсулинозависимого диабета у детей продемонстрировано эпидемиологическими методами. Развитие гепатокарциномы в 73 % случаев связывают с инфицированием вирусом гепатита В, а в 27 % — с заражением вирусом гепатита С. Вирус папилломы выявляют в новообразованиях половых органов у 65 % пациентов из развитых и 87 % больных из развивающихся стран.

Показано, что применение инактивированной вакцины против гриппа снижает госпитализацию в связи с обострением сердечно-сосудистой патологии на 18–20 %, а летальность — на 50 %. В группу риска, которая с помощью гриппозной вакцины может быть защищена от обострения хронической патологии, входят пациенты с диабетом, гипертонической болезнью, ишемической болезнью сердца, нарушениями мозгового кровообращения и хроническими болезнями легких. В США такая группа риска насчитывает 9,9 млн человек.

Данные о влиянии рекомбинантной вакцины против вируса гепатита В на развитие гепатокарциномы получены на Тайване. У привитых детей число диаг-

ностируемых новообразований уменьшилось в 4 раза. В США завершена экспериментальная разработка и начаты клинические испытания вакцины против вируса папилломы.

Ведутся работы по отбору кандидатов в вакцину против *Chlamydia pneumoniae*, рассматриваемой как вероятный индикатор атеросклеротического процесса у человека. Работы основаны на получении рекомбинантных белков с помощью технологий обратной вакцинологии (*reverse vaccinology*). Исследуются 170 протеиновых молекул. Оценивается их способность индуцировать иммунный ответ у лабораторных животных.

Новые идеи в иммунологии, определяющие конструкции вакцин и развитие вакцинных технологий

Длительное время конструирование вакцин шло по пути идентификации и получения чистых протективных антигенов. Однако созданные с помощью генноинженерных технологий такие антигены оказались малоиммуногенными. Решение этой проблемы, как показывает анализ, лежит в использовании новых иммунологических знаний.

В общем виде современная теория иммунитета выглядит следующим образом: ответ на любой чужеродный элемент экзогенной и эндогенной природы развивается в результате взаимодействия 2 взаимосвязанных компонентов иммунитета — системы врожденного и приобретенного (адоптивного) иммунитета. Такое взаимодействие обнаружено у 2 % многоклеточных, включая человека. Общеизвестно, что без активации врожденного иммунитета формирования приобретенного (вакцинного) иммунитета не произойдет.

Система врожденного иммунитета распознает чужеродные элементы (в рассматриваемой ситуации — микроорганизмы) и передает сигнал распознавания лимфоцитам, что ведет к их активации и развитию протективного (вакцинного) иммунитета.

Клетки врожденной системы иммунитета (дендритные, тучные) распознают у микроорганизмов патоген-ассоциированные молекулярные структуры (ПАМС), которые являются консервативными, присущими только микробам и необходимыми для их выживания.

Распознаются ПАМС 2 типами рецепторов. TOLL-подобными рецепторами, встроенными во внешнюю мембрану дендритных и тучных клеток. Описаны 10 таких рецепторов. 2-й тип рецепторов для патогенов — это растворимые рецепторы для фрагмента C1q комплемента, для ЛПС, для маннозы и т. д.

События начальных этапов иммунного ответа характеризуют 3-сигнальной моделью. 1-й сигнал от дендритной клетки Т-лимфоцитам — это предъявление в контексте молекул МНС переработанного ан-

тигена. Однако такого предъявления недостаточно для запуска вакцинного иммунитета. Необходим 2-й — костимулирующий сигнал. Он генерируется дендритной клеткой после того, как клетка распознает ПАМС. За распознаванием следует созревание дендритной клетки, ее активация и экспрессия на мембране костимулирующих молекул (CD80, CD86). Предъявление Т-лимфоцитам антигена без костимулирующего сигнала ведет к специфической гипореактивности или анергии. С ПАМС связывают и 3-й сигнал, который определяет путь дифференцировки Т-лимфоцитов по типу Th-1 или Th-2. Изложенные иммунологические представления послужили теоретической базой для нижеперечисленных предложений и рекомендаций при конструировании вакцин будущего:

- пептидные препараты, полученные с помощью любой технологии, не могут использоваться в качестве вакцин, т. к. они не способны продуцировать костимулирующие сигналы, без которых невозможно развитие перспективного иммунитета;
- для превращения пептидной конструкции в эффективную вакцину следует использовать адъюванты, в качестве которых могут служить природные ПАМС, их синтетические аналоги и ряд цитокинов;
- манипулируя адъювантами, можно направлять развитие иммунного ответа по типу Th-1 или Th-2;
- используя адъюванты, можно создавать вакцины против аллергии, аутоиммунных процессов, злокачественных опухолей и опасных низкомолекулярных соединений (наркотиков);
- открывается перспектива создания индивидуальных вакцин для иммунотерапии рака и ВИЧ-инфекции на основе активированных дендритных клеток;
- вакцины против ВИЧ-инфекции, малярии и туберкулеза должны формировать иммунный ответ типа Th-1;
- активация системы врожденного иммунитета открывает путь для индукции быстрой неспецифической защиты против неизвестных патогенов (вакцины против биотеррора).

Технологии конструирования вакцин

В настоящее время создание новых вакцин идет по пути усовершенствования классических технологий и создания новых технологий на основе достижений геномики и протеомики.

Усовершенствование классических вакцин

Работа идет в нескольких направлениях:

1. Использование в качестве носителя анатоксинов с целью повышения иммуногенности бактериальных полисахаридов. В 2000 г. лицензирована 7-валентная полисахаридная пневмококковая вакцина на основе дифтерийного анатоксина.

2. Создание поликомпонентных вакцин. Актуальность таких конструкций продиктована стремлением уменьшить число инъекций, получаемых ребенком, и снизить таким образом риск заражения вирусом гепатита В или ВИЧ-1, а также минимизировать затраты на организацию прививок. В 2000—2003 г. зарегистрированы АКДС-вакцина с цельноклеточным коклюшным компонентом, объединенная с рекомбинантной вакциной против гепатита В; АКДС-вакцина с бесклеточным коклюшным компонентом, в которую включены рекомбинантная В-гепатитная вакцина и инактивированная полиомиелитная вакцина. В 2001 г. лицензирована комбинированная вакцина против гепатита А (инактивированная) и гепатита В (рекомбинантная). В Европе зарегистрированы 2 б-валентные вакцины против дифтерии, столбняка, коклюша, полиомиелита (инактивированная), гепатита В и *H. influenzae*. При испытании на добровольцах эта вакцина вызывала более слабый гуморальный ответ на полисахарид *H. influenzae*, поэтому в США она не была признана пригодной для практики.
3. Возвращение к разработкам прошлого. В 2003 г. лицензирована 3-валентная гриппозная вакцина из холодоадаптированных температурочувствительных мутантов. Вакцина предназначена для интраназального применения.

Методы создания вакцин на основе достижений молекулярной биологии

В течение практически 20 лет для создания новых вакцин использовали и используют рекомбинантные ДНК-технологии. Начало XXI в. ознаменовалось активным развитием технологии по конструированию достижений геномики и протеомики.

Результаты использования рекомбинантных ДНК-технологий

Как видно из материалов таблицы, разные варианты рекомбинантной технологии использовали для создания вакцин против многих бактерий, вирусов и паразитов, патогенных для человека. Была изучена эффективность живых рекомбинантных вакцин, белков, пептидов, векторов и ДНК-вакцин.

В практику пока вошли только 3 препарата. Рекомбинантная вакцина против гепатита В, предложенная 2 фирмами (1986, 1989), рекомбинантная вакцина против болезни Лайма (1998) и детоксицированный коклюшный токсин, который включен в состав АКДС-вакцины, применяемой в Италии.

В настоящее время стало очевидным, что в большинстве случаев с помощью рекомбинантных технологий получают препараты, обладающие слабой иммуногенностью. Для преодоления рассматриваемого недостатка предложено применять ревакцинацию с использованием для 2-й прививки антигена в иной, чем при 1-й инокуляции, форме (*prime-boost strate-*

gies). Так, обезьянам сначала вводили ДНК-вакцину, кодирующую антигены ВИЧ, а затем их ревакцинировали аттенуированным вариантом вируса осповакцины, экспрессирующим те же антигены. Сообщений о результатах испытаний предложенной схемы вакцинации при работе с добровольцами пока нет.

Современная иммунология объясняет слабую иммуногенность продуктов, получаемых с помощью рекомбинантных технологий, тем, что они лишены патоген-ассоциированных молекулярных структур, распознавание которых необходимо для запуска ответа сначала врожденного иммунитета, а затем развития адаптивного иммунного ответа.

Прогнозируется, что рекомбинантные вакцины получат широкое применение в практике только тогда, когда будут лицензированы для применения на людях новые адъюванты, потенцирующие антигенную активность этих вакцин.

ДНК-вакцины

За последние 10 лет в вакцинологии сформировалось новое направление, основанное на принципе, когда в организм вводится не белок, а нуклеиновая кислота (ДНК или РНК). Это направление называют "генетической иммунизацией", "вакцинацией нуклеиновыми кислотами", "ДНК-вакцинацией" и связывают с этим направлением революционные изменения в вакцинологии ближайшего будущего. Несмотря на то, что способность ДНК и РНК инициировать синтез кодируемых ими белков после проникновения в клетку известна давно, только в середине 90-х гг. прошлого века были осознаны и сформулированы возможности этой технологии применительно к медицине, ветеринарии и фундаментальной науке. Этот новый подход достаточно прост, дешев и, самое главное, дает возможность унифицировать методические подходы. После разработки относительно безопасных векторных систем, повышения эффективности доставки нуклеиновых кислот в ткани и обнаружения возможности длительной (до года) экспрессии чужеродной ДНК в трансформированных клетках *in vivo* стал ясен потенциал этой технологии в генотерапии и создании вакцинных препаратов. В 1993 г. было показано, что ДНК-вакцинация приводит к полноценному иммунному ответу, т. е. к образованию антител (гуморальный ответ) и цитотоксических Т-лимфоцитов (клеточный ответ), и обеспечивает у животных высокий уровень защиты от вирусной инфекции.

Экспериментальная работа по конструированию ДНК-вакцины ведется очень активно, особенно в области конструирования вирусных систем. С января 2000 г. по март 2003 г. опубликованы результаты исследования на мышах 139 конструкций, созданных на основе 18 вирусов, включая ВИЧ-1 и ВИЧ-2, дельта-вирус, вирусы гриппа, кори, гепатита С и т. д.

В рамках указанных исследований изучали разные ДНК-системы, возможность повышения их эффективности за счет использования новых адъювантов и

применения для ревакцинации генноинженерной вакцины другого типа (*prime-boost strategies*). Для ревакцинации, которая проводится после первичного применения ДНК-вакцины, предлагают использовать или рекомбинантный белок, или рекомбинантный вирусный вектор.

Интерес к ДНК-вакцинам стимулирует ряд перспективных свойств, которыми они обладают.

Используя один и тот же плазмидный или вирусный вектор, можно создавать вакцины против различных инфекционных заболеваний, меняя только последовательность, кодирующую необходимые антигены. При этом отпадает необходимость манипулирования с патогенными вирусами и бактериями. Отпадает сложная и дорогостоящая процедура очистки антигенов. Важно также то, что препараты ДНК-вакцин не требуют специальных методов доставки и стабильны длительное время при комнатной температуре.

ДНК-вакцины содержат структуры, распознаваемые системой врожденного иммунитета как чужие (СpG-олигонуклеотиды бактериальной нуклеиновой кислоты). Поэтому от них ожидают высокую иммунологическую эффективность.

Однако прежде чем ДНК-вакцинация войдет в медицинскую практику, следует решить целый ряд вопросов, связанных с безопасностью введения таких препаратов в организм человека, изучить длительность индуцируемого ими иммунитета и последствия для иммунной системы нового способа представления антигена.

Поэтому для того, чтобы этот метод получил широкое применение, необходимо решить целый ряд принципиальных научных вопросов.

До сих пор до конца не ясен механизм поглощения ДНК клетками. Установлено, что лучше всего ДНК поглощается клетками поперечнополосатых мышц (скелетные мышцы, мышцы сердца). При в/м инъекции ДНК происходит трансформация от 0,01 до 1 % фибрилл. Регенерирующие мышцы включают ДНК более интенсивно, вследствие большей доступности миоцитов, когда межклеточные структуры в ткани еще не сформировались. После включения ДНК наблюдается длительный синтез антигена трансформированными клетками. В скелетных мышцах это продолжается 3–6 мес., в сердечной мышце — 14–60 сут.

Существуют данные, что введенная ДНК не встраивается в геном, а длительное время (18 нед.) существует как эписома.

Если эти данные подтвердятся, то многие опасения (инсерционный мутагенез, активация протоонкогенов) отпадут сами по себе.

Несмотря на то, что мышечная ткань поглощает ДНК интенсивнее, чем другие органы, неясно, лучший ли это способ введения таких вакцин в организм. Например, при подкожном введении ДНК поглощается кератиноцитами, фибробластами, макрофагами, клетками Лангерганса. Единичная инъек-

ция обеспечивает полноценный гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ в течение 60–70 нед. Титр антител выше, чем при введении ДНК в мышечную ткань. Есть предположение, что кератиноциты и миоциты, синтезирующие антигены, не способны правильно представлять их иммунной системе. В роли таких клеток могут выступать дендритные клетки и / или макрофаги, которые присутствуют в эпидермисе в большем количестве.

Существует много других способов доставки ДНК (катионные липосомы, вирусные системы). Однако с повышением эффективности доставки падает ее специфичность. Так, липосомы доставляют ДНК в различные органы (сердце, печень, селезенку и т. д.). Последний из разработанных методов введения ДНК-вакцин — "генная пушка". В этом методе используется сжатый гелий, содержащий микрочастицы коллоидного золота с сорбированными на них плазмидами (< 1 мг), экспрессирующими антиген. Препарат вводится в эпидермис. Этот метод эффективнее, чем обычный, по нескольким причинам. Во-первых, эффективность трансфекции выше, т. к. препарат попадает непосредственно в клетки. Во-вторых, усиление иммунного ответа происходит из-за того, что большая часть плазмид прямо контактирует с клетками Лангерганса или трансфицирует кератиноциты, которые способны продуцировать цитокины. Часто для получения более сильного иммунного ответа вместе с антигенами экспрессируются цитокины или молекулы, стимулирующие комплекс МНС / рецептор.

Различия в способе представления антигена при обычной и ДНК-вакцинации — один из наиболее важных и интересных вопросов как для фундаментальной иммунологии, так и для практической медицины. При обычном способе вакцинации экзогенные антигены, такие как вирусные частицы, бактерии, растворимые белки, разрушаются до представления внутри эндосомных образований клетки. Далее они соединяются с молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса для представления комплексов на поверхности клеток Т-хелперным лимфоцитам (Th-типа). При ДНК-вакцинации процесс напоминает вирусную инфекцию. В этом случае вирусные белки синтезируются в цитозоле и протеолитически расщепляются до пептидов, которые переносятся в эндоплазматический ретикулум. Здесь пептиды взаимодействуют с молекулами главного комплекса гистосовместимости I класса (МНСI) и транспортируются к клеточной поверхности для распознавания Th-лимфоцитами класса CD8. Те, в свою очередь, организуют иммунный ответ, стимулируя выработку антител В-клетками, клональную экспансию CTL и активируя макрофаги-киллеры. Есть экспериментальные данные о том, что один и тот же антиген, введенный в организм обычным методом и с помощью ДНК-вакцинации, продуцирует разные варианты иммунного ответа. При ДНК-вакцинации синтезируются имму-

ноглобулины IgG2a, а при обычной — IgG1 и IgE. В 1-м случае максимальный титр антител достигается через 6 нед., а во 2-м — через 1–2 нед. После стимуляции *in vitro* антигеном Т-хелперы животных, вакцинированных ДНК, секретируют интерферон- γ , а после обычной вакцинации — IL-4 и IL-5.

Таким образом, ДНК-вакцинация приводит к т. н. Т-хелперному ответу-1 (Th-1), а обычная — к Th-2.

После первичной иммунизации белком, а последующей ревакцинации ДНК, формируется Th-1-ответ, если же провести иммунизацию наоборот, то Th-1-ответ сохраняется. То есть Th-1-ответ, вызванный ДНК-вакцинацией, доминирует. В ответе иммунной системы важен и количественный аспект. При обычной вакцинации антиген вводится в организм сразу в больших количествах и существует в нем сравнительно недолго. В случае ДНК-вакцинации небольшие количества антигена длительное время синтезируются внутриклеточно. В некоторых случаях Th-1-ответ предпочтительней. Например, анафилаксия вызывается взаимодействием антигена с IgE-антителами, связанными с тучными клетками. Если в крови присутствуют только антитела класса IgG, то происходит нейтрализация антигена и анафилаксия не развивается. Таким образом, ДНК-вакцинация может оказаться предпочтительнее для людей, страдающих аллергическими заболеваниями.

В настоящее время разработаны и испытываются ДНК-вакцины против инфекций, вызываемых вирусами гепатитов В и С, гриппа, лимфоцитарного хориоменингита, бешенства, иммунодефицита человека (ВИЧ), японского энцефалита, а также возбудителями сальмонеллеза, туберкулеза и некоторых паразитарных заболеваний (лейшманиоз, малярия). Выбор инфекций связан не только с их высокой актуальностью для человечества, но и с безуспешными попытками создать надежные вакцинопрепараты классическими, широко используемыми в настоящее время методами.

ДНК-вакцинация представляется одним из самых перспективных направлений в борьбе с раком. Разработаны следующие методические подходы к вакцинотерапии различных опухолей при помощи различных рекомбинантных ДНК:

1. Введение в организм (опухоль) ДНК, кодирующих раковые антигены.
2. Активация антиген-представляющих клеток.
3. Введение в раковые клетки генов цитокинов и иммуномодуляторов.
4. Комбинированные подходы, которые заключаются в одновременном использовании векторных систем, кодирующих раковые антигены, гены "убийства" клетки и цитокины.

Потенциальные раковые антигены включают в себя гликолипиды и гликопротеиды (ганглиозиды), антигены развития (MAGE, тирозиназа, мелан-А, gp75, мутантные онкогены и продукты (p53, HER2/neu). Так, например, перспективной мишенью для иммунотерапии рака является белок p53, антитела к которому

содержат около 20 % больных раком молочной железы и легкого. Противоопухолевый иммунитет к новообразованиям, содержащим этот белок можно вызвать экспериментально ДНК-вакциной, содержащей отдельные эпитопы указанного белка. Получен протективный Т-клеточный иммунный ответ у мышей после ДНК-вакцинации рекомбинантными аденовирусами, кодирующими раковые антигены человека MART-1 и gp100. Показано также, что внутримышечная инъекция плазмидной ДНК, кодирующей ген MUC-1, приводит к развитию гуморального и Т-клеточного ответа и защите 80 % иммунизированных мышей от последующего заражения раковыми клетками. Можно использовать и путь представления раковых антигенов через антиген-представляющие клетки (дендритные клетки, активированные В-клетки, макрофаги). Обнаружена индукция Т-клеточного ответа у шимпанзе к муцину после вакцинации аутологичными В-лимфоцитами, трансформированными вирусом Эпштейна–Барр, несущим ген, определяющий синтез муцина (MUC-1). Трансформация клеток рака легкого рекомбинантной ДНК, синтезирующей IL-3, приводит к повышению уровня CTL, что связано со стимуляцией IL-3 образования макрофагоподобных антигенпредставляющих клеток, концентрация которых увеличивается в опухоли. Выраженный противораковый эффект вызывает и синтез в раковых клетках различных цитокинов. Местный синтез цитокинов часто более эффективен, чем системное введение в организм, и не сопровождается побочным действием. Кроме того, показано, что вылеченные мыши приобретают устойчивость к заражению злокачественными клетками. Так, ДНК-вакцинация геном тимидинкиназы вируса герпеса с одновременной экспрессией гена IL-2 при раке толстой кишки приводит не только к регрессии опухоли, но и вызывает формирование Т-клеточного ответа. Все эти результаты позволяют считать вакцинотерапию опухолей одним из самых перспективных подходов к борьбе с этой группой заболеваний. Достаточно сказать, что в настоящее время за рубежом уже 6 вакцинных противоопухолевых препаратов проходят различные стадии клинических испытаний, а еще около 10 к таким испытаниям подготовлены.

Недостатки этого подхода связаны прежде всего с тем, что его эффективность на людях пока ниже, чем на мышиных моделях. Однако стремительное развитие методических подходов к исследованию молекулярных механизмов иммунного ответа в онкогенезе позволит в самом ближайшем будущем (3–4 года) их преодолеть.

Генетические вакцины, базирующиеся на вирусных и бактериальных векторах

Данный подход предусматривает использование природного тропизма вектора (вируса или бактерии) по отношению к определенным типам клеток, что существенно увеличивает адресность доставки необходимой генетической информации и может быть использовано в терапевтических целях.

История использования вирусов в качестве вакцинных векторов насчитывает уже более 10 лет. За это время определились основные векторные системы, среди которых наибольшую популярность получили покс- и аденовирусные (Ад-) векторы.

Созданы 3 поколения Ад-векторов, которые классифицируются по локализации и размеру делений в вирусном геноме. В вирусных векторах 1-го поколения делегирована E1-область, ответственная за регуляцию транскрипции (активация и ингибирование) вирусных и клеточных генов и ингибирование апоптогенных сигналов, возникающих в клетке в ответ на вирусную инфекцию. Также в векторах 1-го поколения может быть делегирована E3-область, кодирующая белки, которые взаимодействуют с иммунной системой хозяина. В векторах 2-го поколения дополнительно делегированы E2-область (обеспечивает репликацию вирусного генома) и / или E4-область (участвует в регуляции транскрипции и ингибировании апоптоза). Векторы 3-го поколения содержат только инвертированные концевые повторы и сигнал упаковки.

Ад-векторы имеют несколько существенных преимуществ перед другими векторными системами. Во-первых, как уже было отмечено, из генома удалены области, ответственные за взаимодействие с клеткой, что делает вектор безопасным и практически инертным с точки зрения взаимодействия с клеткой. Во-вторых, разработано большое количество Ад-векторов с измененным за счет модификации структурных белков тропизмом. Такие векторы способны обеспечивать селективную доставку генетической информации в различные ткани организма. Тканевая специфичность Ад-векторов также обеспечивается заменой промоторов ранних областей, необходимых для репликации вирусного генома на определенные тканеспецифические промоторы. В-третьих, разработан обширный инструментарий, который позволяет обеспечить быстрое получение различных рекомбинантных вирусов не только в эукариотических клетках (клетки млекопитающих, дрожжи), но и в бактериях при использовании членичных плазмидных конструкций или космид. В качестве дополнительного преимущества Ад-векторов может выступать способность их структурных белков активировать клеточный иммунный ответ. Однако иммуногенность данных белков, в случае наличия в реципиенте предсформированного иммунитета в результате перенесенной аденовирусной инфекции, может существенно снизить эффективность использования генетической вакцины.

Полностью протективный цитотоксический иммунный ответ удалось получить при использовании для вакцинации против возбудителя малярии *Plasmodium yoelii* Ад-вектора, экспрессирующего белок CS. Ад-вектор в данном исследовании использовался для праймирования иммунного ответа, после чего производилось бустирование поксвирусным вектором, экспрессирующим тот же белок.

В другом случае внутрикожное либо внутримышечное введение Ад-вектора, экспрессирующего гликопротеин G вируса бешенства вызывало развитие иммунитета, который полностью предотвращал экспериментальное заражение мышей. Испытаны вакцины, вызывающие развитие протективного иммунитета по отношению к вирусу Эбола. В этом случае протективный иммунитет был индуцирован путем праймирования рекомбинантной плазмидой, экспрессирующей гликопротеин (GP(Z)), и последующего бустирования рекомбинантным аденовирусом, экспрессирующим тот же белок. При других сочетаниях (ДНК-вакцина + ДНК-вакцина; рекомбинантный Ад + рекомбинантный Ад) не удалось добиться предотвращения гибели животных при экспериментальном заражении.

Другим активно развивающимся направлением является генетическая вакцинация, базирующаяся на использовании бактериальных векторов. Главными преимуществами таких векторов являются их способность индуцировать гуморальный ответ в слизистых, что имеет первостепенную значимость при целом ряде заболеваний, а также возможность использования их для пероральной иммунизации. В качестве экспериментальных векторных систем были испытаны аттенуированные штаммы шигелл, сальмонелл и листерий.

Оценивая эффективность генетических вакцин, базирующихся на бактериальных векторах, следует отметить, что это, несомненно, перспективное направление требует дальнейшего изучения с точки зрения как эффективности, так и безопасности.

Для всех генетических вакцин, базирующихся на вирусных и бактериальных векторах, существенным ограничением может становиться наличие предсуществующего иммунитета. Преодоление этого негативного для иммунизации фактора возможно путем использования в качестве векторов микроорганизмов, относящихся к другим серотипам.

Обратная вакцинология и протеомика

Безуспешные попытки создания новых вакцинпрепаратов против некоторых инфекционных заболеваний, таких как ВИЧ-инфекция, гепатит С, малярия, стрептококковая инфекция, а также бурное развитие в последнее 10-летие геномики, биоинформатики и протеомики привело к возникновению совершенно нового подхода к созданию вакцин, получившего название "обратная вакцинология" (*reverse vaccinology*).

В современной литературе используют 2 понятия, характеризующие протеомику — функциональная и структурная протеомика.

Функциональная протеомика описывает количественные и качественные изменения при экспрессии белков во время дифференциации, пролиферации и сигнализации клеток; сопоставляет эти изменения с экспрессией генов.

Структурная протеомика идентифицирует молекулярные структуры, т. е. аминокислотные последо-

вательности белковых молекул, вовлеченных в конкретный процесс, и соотносит эти данные с информацией об идентифицированных генах.

Предложенный термин "обратная вакцинология" четко выражает суть нового технологического приема. Если раньше при создании кандидатов в вакцину шли по нисходящей — от целого микроорганизма к его составляющим, то теперь предлагается противоположный путь — от генома к его продуктам. Такой подход основан на том, что большинство протективных антигенов являются белковыми молекулами. Поэтому полные знания обо всех белковых компонентах любого патогена могут позволить определить те из них, которые являются потенциальными кандидатами на включение в состав вакцинного препарата. До недавнего времени разработка вакцин на базе данных о полной структуре геномов и белков была невозможна из-за недостаточного количества знаний и отсутствия некоторых технологий. Однако геномная и постгеномная революция резко изменили ситуацию. Определение нуклеотидной последовательности полного генома возбудителей инфекционных заболеваний в настоящее время — вопрос, если не нескольких дней, то нескольких недель. Причем предварительная работа по получению библиотек клонов ДНК возбудителя (плазмиды, содержащие вставку ДНК возбудителя 2 или 10 кв) уже давно проводится с помощью стандартных коммерческих наборов ферментов.

Современные приборы для автоматического определения нуклеотидной последовательности позволяют проводить в год до 14 млн реакций. Таким образом, за период с 1997 г. по 18 марта 2003 г. определена полная нуклеотидная последовательность 78 бактериальных патогенов. Полная компьютерная сборка генома и его описание с полным списком кодируемых белков при помощи компьютерных программ занимает в настоящее время несколько месяцев. В результате этого анализа исследователь имеет не только список возможных кодируемых белков, но и некоторые их характеристики. Такие, например, как принадлежность к определенным группам на основе предполагаемых их функций, возможную локализацию внутри бактериальной клетки, секреторную способность, ассоциированность с мембраной, антигенные свойства. Поэтому такой компьютерный анализ (*in silico*) определяет первую важную стратегию по отбору возможных кандидатов в вакцинный препарат.

Другим важнейшим критерием для отбора антигенов является анализ транскрипционной активности отдельных генов патогена, используя изучение микропостроения ДНК. Цель этой технологии — одновременное измерение уровней синтеза мРНК всех продуктов генов, экспрессирующихся в живой клетке. Для этих целей используется целый ряд методов, суть которых заключается в том, что на нейтральных носителях с помощью специально синтезированных фрагментов ДНК исследуются все возможные рамки

считывания исследуемого патогена. Эксперименты проводятся несколько раз в различных условиях для набора достоверных статистических данных. Разработаны и специальные компьютерные программы, позволяющие рисовать транскрипционные профили всех изучаемых генов. Эта технология дает полную картину транскрипционной активности патогена и позволяет провести сравнительную характеристику экспрессии генов в различных условиях роста и определить гены, специфически регулируемые во время инфекции. Очень часто продукты таких генов представляют наибольший интерес для создания вакцинных препаратов.

3-й подход к отбору кандидатов в вакцины базируется на протеомной технологии, методы которой позволяют в значительной мере детализировать количественную и качественную характеристики белков в различных клеточных компонентах микроорганизма. В настоящее время разработан целый ряд методов выделения, очистки и исследования белковых молекул. В протеомике используются практически все известные методы количественного и качественного анализа белков, начиная с обычного и двумерного электрофореза, хроматографии, которые могут дать только предварительные характеристики молекулярной массы и количества белка в клетке. Однако полный переворот в протеомике произвел метод масспектрографии и его различные модификации. С помощью этого метода сейчас можно дать полную количественную и качественную характеристики белковых продуктов, определить принадлежность белка к той или иной группе, указать его локализацию в клетке. Кроме того, существуют компьютерные программы, которые, используя базы данных об известных и хорошо изученных белках, могут по аминокислотной последовательности предсказать не только трехмерную структуру изучаемого белка, но и его свойства и функции.

Используя эти 3 стратегии можно отобрать тот пул генов (белков) которые представляют определенный интерес для создания вакцинного препарата. Как правило, этот пул включает в себя около 20–30 % всех генов (белков) бактериального генома.

Эта отобранная группа нуждается в дальнейшей проверке на возможность вызывать протективный ответ в организме. Для этого необходимо экспрессировать отобранный антиген в различных гетерологических системах и очистить его в необходимых для иммунизации животных количествах. Уже разработан целый ряд векторных систем и методов для клонирования и экспрессии клонированного гена в бактериальных и эукариотических клетках, которые позволяют нарабатывать белок в любых препаративных количествах. Для очистки необходимого белка в настоящее время используются специальные полностью автоматизированные приборы, которые позволяют выделить и очистить большое количество исследуемых белков, достаточное для иммунизации. Так, например, используя эти технологии, лаборато-

рия, состоящая из 3 исследователей, может в течение месяца выделить и очистить более 100 различных исследуемых белков.

Впервые этот подход был использован для создания вакцины против менингококков группы В (*Neisseria meningitidis B*). Несмотря на то, что против менингококков других серогрупп существуют надежные вакцинные препараты, основанные на оболочечных полисахаридах, такой подход для менингококков серогруппы В оказался неэффективным по нескольким причинам. Поэтому нуклеотидная последовательность генома этого микроорганизма была проанализирована в специальных программах для поиска генов, потенциально кодирующих белки, которые могли бы экспонироваться на поверхности или секретироваться. Предположительно такие свойства могли иметь 650 потенциальных белков. Половину из них удалось экспрессировать в бактериальной системе, выделить, очистить и провести ими иммунизацию животных. В результате работы удалось идентифицировать 5 высококонсервативных антигенов у 34 штаммов, которые вызывали продукцию защитных антител. Параллельно провели сравнительный анализ транскрипционной активности генов *N. meningitidis B* при взаимодействии с человеческими эпителиальными клетками и в других условиях. 12 белков, чья транскрипция активировалась во время адгезии, были выделены и проверены на иммунологическую активность. В результате были отобраны 5 различных белков, после введения которых зафиксировали синтез протективных антител. Протеомное изучение мембранной фракции белков этого возбудителя позволило идентифицировать 250 белков, 20 из которых были экспрессированы в *E. coli* и проверены на иммунологическую активность. 2 исследованных белка индуцировали антитела, способные убивать менингококки группы В. В результате была создана комбинация антигенов, способных защищать от инфекции, и разработан вакцинопрепарат.

Используя описанный подход, создали вакцинопрепараты против инфекций, вызываемых *Streptococcus agalactiae* (2002), *Staphylococcus aureus* (2002), *S. pneumoniae* (2001), *Porphyromonas gingivalis* (2001), *Chlamydia pneumoniae* (2002) и *Plasmodium falciparum* (2000).

Возможность идентифицировать сотни новых потенциальных кандидатов в вакцинные препараты, используя данные о полной геномной последовательности микроорганизма, позволит полностью революционизировать вакцинологию. С помощью классических подходов можно было определить только несколько кандидатов, которые часто оказывались неудачными после нескольких лет исследований. Успехи в технологии определения нуклеотидных последовательностей открывают возможность очень быстро определять полные геномные последовательности для большинства инфекционных патогенов. Эти возможности в комбинации с высокоразвитыми и автоматизированными методами биоинформатики, даю-

щими полную характеристику кандидатов в вакцины, уже в ближайшие 5–10 лет позволят завершить эксперименты по созданию кандидатов в вакцины и начать их клиническое испытание. Очевидно, что эти кандидаты окажутся эффективными только в том случае, если они будут сочетаться с новыми адъювантами, поскольку получаемые методом обратной вакцинологии белки, как предполагают, не содержат или содержат в недостаточной степени патоген-ассоциированные молекулы. В настоящее время распознавание названных молекул рассматривают как ключевой момент в запуске иммунного ответа и формировании протективного иммунитета.

Обратная транскрипция (*reverse transcription*)

В последнее время довольно часто для подготовки вакцинных штаммов различных микроорганизмов прибегают к давно разработанной методике сайт-направленного мутагенеза. Для того чтобы получить аттенуированный штамм микроорганизма в нуклеотидную последовательность его генома искусственно вносят точечные мутации, не влияющие на антигенную структуру, но изменяющие другие свойства вируса (инфекционность, способность адаптироваться к росту на определенных линиях клеток и др.). Чтобы изменить нуклеотидную структуру какого-либо гена искусственно синтезируют олигонуклеотиды, практически повторяющие последовательность гена с необходимой мутацией, и в определенных условиях синтезируют новый ген с необходимыми свойствами либо клонируют мутантный ген в геноме возбудителя. Именно таким способом в настоящее время предлагают создавать вакцинопрепарат против вируса птичьего гриппа с антигенной структурой H5N1. Имеются сообщения, что потребовалось всего 30 дней для создания методом обратной транскрипции кандидата в посевной штамм, планируемый для производства вакцины против ожидаемого пандемического вируса гриппа.

Способы усиления иммуногенности генноинженерных продуктов

В настоящее время ни у кого не вызывает сомнения тот факт, что полученные методами ДНК-рекомбинации белки обладают слабой иммуногенностью. Прогнозируется, что продукты обратной вакцинации также будут демонстрировать недостаточную антигенность. Поэтому разработка способов усиления иммуногенной активности генноинженерных продуктов рассматривается как один из ключевых моментов развития новой вакцинологии. Разработка идет в 2 направлениях — создание и апробация разнообразных адъювантов и конструирование систем доставки антигена в организм.

Адъюванты

На протяжении многих 10-летних единственными адъювантами, применявшимися при создании вак-

цин, были гидроокись и фосфат алюминия. Однако их использование при конструировании новых вакцин, особенно тех, которые должны стимулировать развитие иммунного ответа по Th-1-типу, ограничено.

В России создан и разрешен для применения в практике биodeградируемый полимер с выраженной адъювантной активностью, получивший название "полиоксидоний". Клетками-мишенями для полиоксидония являются факторы врожденного иммунитета — моноциты / макрофаги, естественные киллеры. Этот адъювант входит в состав лицензированной инактивированной гриппозной вакцины, хорошо зарекомендовавшей себя в практике. Полиоксидоний использовали при создании вакцин для иммунотерапии полииозов. При конструировании нового варианта бесклеточной вакцины гидроокись алюминия была заменена полиоксидонием.

Весьма активно изучаются адъюванты микробного происхождения и их синтетические аналоги. Интерес к этой группе адъювантов обусловлен тем, что они взаимодействуют с Toll-подобными рецепторами клеток врожденного иммунитета и запускают процесс формирования адортивного иммунитета.

В состав рассматриваемой группы входят очищенный дериват ЛПС-Липид А (MPL), пептидогликан, тейхоевая кислота, липопептиды, флагеллины, синтетические олигонуклеотиды бактериальной ДНК (CpG), полученный химическим путем ацетилированный моносахарид, структурно сходный с Липидом А (AGP), синтетические липопептиды, минимальный компонент пептидогликана (МДР) и др.

Для ряда природных и синтетических адъювантов микробного происхождения определены конкретные Toll-подобные рецепторы (ТЛР), с которыми они взаимодействуют, что позволит рационально определять возможные области применения этих адъювантов. Для МДР и липопептидов — это ТЛР-2 и ТЛР-6, для MPL — ТЛР-4, для флагеллина — ТЛР-5, для CpG — ТЛР-8, ТЛР-9.

MPL испытали как адъювант в составе вакцин против гриппа, герпеса и гепатита В. Под наблюдением находились более 10 тыс. человек.

Исследования других представителей бактериальных адъювантов не вышли за рамки доклинических испытаний или 1-й фазы клинических испытаний.

Много внимания уделяется адъювантам, стимулирующим иммунный ответ слизистых покровов (мукозальные адъюванты). Подробно этот вопрос рассмотрен ниже.

В качестве адъювантов испытывают разнообразные биологически активные молекулы эндогенного происхождения. К ним относятся белки теплового шока и различные цитокины.

Белки теплового шока (БТШ) обладают способностью доставлять антиген антиген-представляющим клеткам и запускать т. н. костимулирующий сигнал, необходимый для развития адаптивного иммунитета

(экспрессия костимулирующих молекул, секреция противовоспалительных цитокинов).

Начаты клинические испытания индивидуальной противораковой вакцины, в состав которой входят пептиды опухоли конкретного пациента и БТШ.

Несмотря на большое число исследований, пока остается неясным, какой из цитокинов может быть рекомендован в качестве адьюванта при конструировании вакцин.

Имеются сообщения о способности гранулоцит-моноцит-колониестимулирующего фактора (GM-CSF) потенцировать развитие клеточного иммунитета к опухолевым антигенам у раковых пациентов.

Продемонстрирована активация мукозального иммунитета под влиянием IL-1 α и IL-1 β .

Выявлены закономерности, которые следует учитывать при использовании цитокинов в качестве адьювантов: 1) максимальная доза не всегда дает оптимальный результат; 2) комбинация цитокинов позволяет существенно усилить адьювантный эффект.

Однако внедрение новых адьювантов в практику невозможно без решения следующих проблем:

1. Для адьювантов, планируемых для конструирования оральных вакцин, необходимо убедиться, что они не нарушают толерантность кишечника к пищевым аллергенам. Возникновение такого эффекта создаст предпосылки для развития аллергии.
2. Требуется доказать, что предполагаемое сочетание определенного антигена с адьювантом не поведет к развитию аутоиммунитета. Подобное развитие событий может произойти в тех случаях, когда конкретный бактериальный антиген имеет структуры, идентичные структурам клеток хозяина.
3. Следует предсказать пути развития иммунного ответа при каждой предлагаемой комбинации антигена и адьюванта, особенно в тех случаях, когда антиген сам обладает иммуностимулирующей активностью.

Системы доставки антигенов

Способность доставлять генноинженерные продукты антигенпредъявляющим клеткам выявлена у значительной группы соединений. К ним относятся микрочастицы, липосомы и виросомы. Помимо функции доставки антигена эти соединения обладают адьювантной активностью. Кроме того, они способны доставлять и адьюванты. Наибольшее внимание сейчас привлекают водно-масляный адьювант MF59 (см. выше) и иммуностимулирующие комплексы (ISCOM), а также виросомы.

Имуностимулирующий комплекс (ISCOM)

Комплекс состоит из иммуностимулирующей фракции, источником которой является *Quillaja saponaria*, инкорпорированная в жировые частицы, образованные холестеролом, фосфолипидами и антигенами клеточных мембран.

До начала 2004 г. вакцины на основе ISCOM были изучены на разных видах лабораторных животных

и 1 000 волонтеров, при проведении 1-й фазы клинических испытаний.

Показано, что ISCOM-вакцины индуцируют смешанный Th-1 и Th-2 иммунный ответ, эффективны при интраназальном применении и запускают реакции как врожденного, так и приобретенного иммунитета в присутствии антител, нейтрализующих вирус.

ISCOM использовали при конструировании вакцин против вирусов гриппа, ВИЧ, папилломы человека, псевдобешенства, возбудителя малярии и ряда опухолей (опухоль яичек, рак шейки матки). В состав ISCOM встраивали генноинженерные продукты.

Предполагается, что ISCOM найдет применение при конструировании вакцин для создания быстрой иммунологической защиты (в случае пандемии гриппа) или при разработке терапевтических вакцин, которые будут использоваться при вирусном гепатите В и С, ВИЧ-инфекции, малярии, герпес-вирусной инфекции типа 1 или 2 и инфекции *H. pylori*.

Виросомы

Этот тип носителя с адьювантными свойствами представляет оболочки вируса гриппа, освобожденные от нуклеокапсида и нуклеиновой кислоты. Виросомы несут функциональные вирусные гликопротеины — гемагглютинин и нейраминидазу.

Виросомы защищают антиген от экстрацеллюлярной деградации, создают депо антигена, способствуют презентации антигена В лимфоцитам и доставке антигена дендритным клеткам, а также захвату его этими клетками. Виросомы стимулируют презентацию антигена в контексте как МНС-1, так и МНС-2 молекул.

На базе виросом созданы новые варианты вакцины против гепатита и вируса гриппа, АКДС-вакцина.

Виросомная вакцина против гепатита А в опытах на волонтерах (при оценке гуморального ответа) оказалась в 2 раза более эффективной по сравнению с аналогичным препаратом, содержащим гидроксид алюминия.

Предложена виросомная 3-валентная вакцина для профилактики гриппозной инфекции. В ее состав в качестве носителя и адьюванта входят моновалентные виросомы, каждая из которых несет гемагглютинин и нейраминидазу одного из штаммов, актуального, по данным ВОЗ, для конкретного сезона.

Виросомные вакцины против гепатита А и гриппа лицензированы в Европе.

Липосомы

Классические липосомы — это пузырьки из фосфолипидов. Кроме того, имеется значительное число вариантов липосом. Несмотря на обнадеживающие экспериментальные результаты, для применения липосом в вакцинологии требуется решить серию иммунологических и технологических проблем. Ожида-

ется, что липосомные вакцины появятся на рынке не ранее 2015–2200 г.

Прикладная вакцинология сегодняшнего и завтрашнего дня

Генетически инактивированные токсины (рекомбинантные анатоксины)

Химическая инактивация бактериальных токсинов с помощью формальдегида предложена в 1923–1924 гг. и применяется в производстве до настоящего времени. Специалисты подчеркивают, что полученные таким способом анатоксины сохраняют способность к реверсии.

Рекомбинантные анатоксины лишены потенциальной опасности химически инактивированных препаратов. В общем виде схема получения генетически инактивированных токсинов выглядит таким образом: делеция участка гена, кодирующего детоксичность; клонирование модифицированного гена; введение его в систему экспрессии; получение иммуногенного белка, лишённого токсичности.

Получены генетически инактивированные токсины возбудителя коклюша, дифтерии, синегнойной инфекции, сибирской язвы, столбняка.

Генетически инактивированный коклюшный токсин (ГИКТ) рассматривают как 1-ю бактериальную субъединичную вакцину, полученную рекомбинантным методом.

Безопасность и иммуногенность ГИКТ были продемонстрированы при клинических испытаниях анатоксина как такового, его комбинации с филаментозным геммагглютинином и пертактином, а также при использовании АКДС-вакцины, содержащей или традиционный анатоксин, или рекомбинантный коклюшный белок. В ходе работы продемонстрировали, что все варианты препаратов с ГИКТ вызывали появление токсинейтрализующих антител в высоких титрах, равно как и развитие выраженного Т-клеточного ответа.

В настоящее время АКДС-вакцина с ГИКТ используется в Италии.

Генетически инактивированный дифтерийный токсин (ГИДТ) получен в 70–80 гг. прошлого века. Он обозначается аббревиатурой GRM197 и отличается от нативного токсигена замещением С52 глицина глутаминовой кислотой. Для его окончательной детоксикации необходима концентрация формалина 1 : 100, которая нужна для инактивации нативного токсина.

Безвредность ГИДТ, конъюгированного с полисахаридами *H. influenzae* типа В или *S. pneumoniae*, продемонстрирована в эксперименте.

Разработана технология получения рекомбинантного протективного антигена (РПА), являющегося важным компонентом токсина сибирской язвы. Создана ДНК-вакцина, продуцирующая РПА.

В 2002 г. начато промышленное освоение производства РПА токсина сибирской язвы.

Генетически инактивированный экзотоксин типа А *P. aeruginos* (REPA) использовали как носитель при создании брюшнотифозной вакцины. Vi-антиген конъюгировали с REPA. Эта конструкция была безопасна и иммуногенна как при введении взрослым, так и детям до 5–14 лет. Она вызвала бустер-ответ у детей младшего возраста (2–4 года). Конструкция Vi антиген + REPA оказалась высокоиммуногенной при интрадермальном введении, после которого у 90 % детей развивался иммунный ответ.

Метод генетической инактивации применили для получения кандидатов в мукозальные адьюванты на основе экзотоксина *V. cholerae* и термолабильного токсина энтеротоксигенной *E. coli*.

Терапевтические вакцины

Терапевтические вакцины (ТВ) — это препараты, которые индуцируют развитие иммунного ответа, направленного на прекращение или смягчение (облегчение) существующего заболевания. Спектр реального или прогнозируемого применения ТВ весьма широк и включает в себя: 1) хронические заболевания, ассоциированные со смешанной бактериальной или бактериально-вирусной инфекциями; 2) хронические инфекции, возбудителями которых являются вирусы гепатита В и С, папилломы, ВИЧ; 3) опухоли, прежде всего меланома, рак молочной железы или прямой кишки; 4) аллергические или аутоиммунные заболевания (рассеянный склероз, диабет I типа, ревматоидный артрит).

В настоящее время на рынке широко представлены ТВ для лечения хронических воспалительных заболеваний, ассоциированных со смешанными бактериальными или бактериально-вирусными инфекциями. Имеются ТВ для терапии аутоиммунных процессов.

Перечисленные препараты получены методами классической вакцинологии. Они состоят из лизатов и антигенных комплексов штаммов условнопатогенных микроорганизмов, рассматриваемых как доминирующий возбудитель инфекции дыхательных путей или мочеполового тракта (пневмококк, стафилококк, клебсиелла, кишечная палочка т. д.).

Бактериальные ТВ вызывают развитие адаптивного иммунитета к входящим в их состав микроорганизмам, нормализуют вторичные иммунодефициты, сопровождающие хронический инфекционный процесс, и активизируют за счет входящих в их состав патоген-ассоциированных молекулярных структур врожденный иммунитет, что приводит к быстрому развитию неспецифической резистентности.

Разрешены для применения и используются Иммуновак-ВП-4 (Россия), анатоксин стафилококковый очищенный (Россия), Рибомунил (Франция), Солко-уровак (Болгария).

Для лечения ревматоидного артрита применяют препарат субреум, состоящий из лизата 18 штаммов кишечной палочки.

Завершены экспериментальная разработка и первые клинические испытания нового класса терапевтических вакцин (аллерготропинов) для лечения аллергии. Эти препараты представляют собой конъюгат аллергоидов из пыльцы растений с новым иммуномодулятором, созданным в России, — полимерным физиологически активным соединением, получившим название “полиоксидоний”. Полиоксидоний направляет развитие иммунного ответа по Th-1-типу. При применении пациентам с поллинозом лечебный эффект аллерготропинов из пыльцы тимopheевки, березы и полыни достигал 80 %.

Прогнозируется, что к 2020 г. существенно увеличится применение в медицинской практике ТВ за счет расширения выпуска традиционных препаратов и создания вакцин нового поколения для терапии рака, аллергии и аутоиммунных заболеваний.

Ожидается, что эффективность ТВ возрастет за счет включения в их конструкцию новых адъювантов, например CpG-олигонуклеотидов бактериальной ДНК.

Появились сообщения об эффективности ДНК-вакцин в составе микрочастиц при лечении рака прямой кишки у мышей. ДНК-вакцина, адсорбированная на катионовых микрочастицах, продемонстрировала четкую антиопухолевую активность при применении пациентам и с папилломатозом, ассоциированным с вирусом папилломы человека типа 16. Исследования были выполнены в рамках 1-й фазы клинических испытаний.

Предсказывается создание ТВ на основе активированных дендритных клеток. В этом случае успех работы будет в значительной мере определяться выбором адъюванта, потенцирующего созревание этих клеток и экспрессию на их поверхности костимулирующих молекул CD80 и CD86.

Проведены серия доклинических испытаний и 2 клинических исследования терапевтических дендритных вакцин против ВИЧ-1. Четко продемонстрирована их способность вызывать развитие клеточного иммунитета у здоровых людей. Убедительных данных, свидетельствующих об их влиянии на развитие вирусной инфекции, пока не получено.

Вакцины для профилактики и иммунотерапии злокачественных заболеваний, в том числе дендритные вакцины

Рассматривают 2 типа противораковых вакцин. 1 тип направлен против новообразований, ассоциированных с вирусами или бактериями. К таким новообразованиям относят первичную гепатокарциному (вирусы гепатита В или С), саркому Копоши (вирус простого герпеса), В-клеточную лимфому (ВИЧ-1), злокачественные опухоли полового тракта и плоскоклеточный рак (вирус папилломы), лимфому Баркита и назофарингиальный рак (вирус Эпштейна–Барр), Т-клеточный лейкоз взрослых (Т-лимфотропный вирус I и II типа), аденокарциному, лимфому желудка (*H. pylori*).

Другой тип противораковых вакцин — это вакцины против спонтанных опухолей.

Получены первые доказательства того, что вакцины против вируса гепатита В обладают несомненной способностью предупреждать развитие гепатокарциномы. Среди привитых детей, живущих на Тайване, частота развития этой опухоли сократилась на 50 %, смертность от нее — на 70 %.

Лицензированной вакцины против вируса папилломы пока нет. Имеются сообщения об испытании нескольких кандидатов в вакцину, различающихся по своей структуре. Завершена работа по оценке препарата из вирусоподобных частиц, лишенного ДНК, в рамках 2-й фазы клинических испытаний. Идет испытание рекомбинантных пептидов и вирусных онкопротеинов Е6 и Е7, для усиления иммуногенности которых использовали разнообразные адъюванты.

В экспериментах на животных идет апробация, по меньшей мере, 9 ДНК-вакцин против вируса простого герпеса I типа и 6 ДНК-вакцин против этого вируса II типа.

Завершено доклиническое изучение вакцины из цельных клеток *H. pylori*. Прошли 1-ю фазу испытаний вакцины из рекомбинантных белков конъюгированных с мутантами токсинов возбудителя холеры или с *E. coli*.

Проблема вакцинотерапии спонтанных опухолей разрабатывается достаточно долго. К 2000 г. стало очевидным, что использование опухолеассоциированных антигенов (ТАА) не дает желаемого эффекта. Это обусловлено развитием под влиянием опухолей периферической толерантности к ТАА, подавлением функции антигенпредставляющих клеток IL-10 или IL-6, секретируемых злокачественными клетками.

Начата проверка гипотезы, согласно которой иммунологические нарушения при новообразованиях можно преодолеть и вызвать развитие специфического иммунного ответа с помощью т. н. дендритных вакцин.

Суть метода состоит в следующем: *ex vivo* из моноцитов пациента в присутствии гранулоцит- / макрофаг-колониестимулирующего фактора получают незрелые дендритные клетки, затем иницируют их созревание. Для этой цели используют продукты, несущие патоген-ассоциированные молекулярные структуры (цельные бактериальные клетки, ЛПС, ДИК бактерий и т. д.) или провоспалительные факторы и их комбинации (IL-1 β , ФНД- α , IL-6 и т. д.). Затем зрелые дендритные клетки нагружают опухолевым антигеном и вводят в организм донора.

Существует мнение, что для изготовления оптимальной противоопухолевой вакцины следует инкубировать незрелые дендритные клетки с опухолевыми антигенами (лизат опухолевых клеток, специфичные для опухоли пептиды или белки, опухолевая РНК и т. д.) в присутствии вышеперечисленных препаратов, стимулирующих созревание этих клеток.

Предлагают разные варианты дендритных противораковых вакцин: 1) дендритные клетки, обработанные тумор-ассоциированными антигенами; 2) дендритные клетки, слившиеся с опухолевыми клетками; 3) дендритные клетки, обработанные mРНК, когда ассоциированные с опухолью неизвестны.

Следует подчеркнуть, что дендритные вакцины могут использоваться для лечения как спонтанных опухолей, так и новообразований, ассоциированных с вирусами, поскольку антигены последних относятся к классу опухоль-ассоциированных антигенов, к которым принадлежат также белки, возникшие в результате соматических мутаций; антигены, не экспрессируемые в соматических тканях здорового человека (α -фетопротеин, теломераза) и антигены, гиперэкспрессируемые опухолью. Имеются сообщения о первых результатах испытания дендритных противораковых вакцин на людях. Исследования проводили на ограниченных группах пациентов в IV стадии заболевания.

Четко доказана безвредность вакцин. В ряде случаев наблюдали положительный клинический эффект.

Высказывается предположение, что дендритные вакцины окажутся эффективными для продления безрецидивного периода онкологических больных после максимальной циторедукции хирургическим путем и / или при помощи химиотерапии. В экспериментах на мышах показана возможность предупреждения рецидива карциномы после хирургического вмешательства при применении дендритной вакцины.

Перспективы использования ДНК-вакцин для иммунотерапии злокачественных образований рассмотрены выше.

Неинъекционные вакцины

Необходимость разработки вакцин для непарентерального введения продиктована следующими обстоятельствами:

- стремлением повысить безопасность процедуры вакцинации, снизить затраты на ее проведение и сделать эту процедуру более приемлемой (привлекательной) для населения. В настоящее время ребенок первых лет жизни получает в развитых странах до 17–20 лечебных и вакцинальных инъекций. Ожидается, что по мере расширения календаря прививок число инъекций будет увеличиваться;
- предположением, что доставка антигена в зоны локализации дендритных клеток, рассматриваемых в настоящее время как главное звено запуска иммунного ответа, существенно повысит эффективность вакцинации.

Интенсивно разрабатываются вакцины для орального, назального применения и транскожной иммунизации. Первые 2 типа вакцин объединяются понятием мукозальные вакцины.

Мукозальные вакцины

Преимущества мукозальных вакцин обусловлены не только удобством для пациентов, а прежде всего тем, что этот метод стимулирует иммунный ответ во входных воротах большинства известных патогенов. При этом взаимодействие антигена с определенным участком слизистой (кишечника) ведет к стимуляции иммунных реакций в мукозальной системе в целом, а также к развитию системного иммунного ответа. Мукозальные поверхности человеческого тела имеют площадь около 400 м² и являются важнейшим компонентом иммунной системы. Большинство наружных мукозальных поверхностей насыщены фолликулами и важнейшими лимфоидными элементами, включая В-клетки, Т-лимфоциты, плазматические клетки и другие клеточные элементы, участвующие в индукции и поддержании иммунного ответа. Так, установлено, что CD4+ и CD8+Т-лимфоциты составляют около 80 % всей популяции клеток мукозальной поверхности.

Показано также, что вакцины, нанесенные на слизистые оболочки, вызывают не только общий, но и местный иммунный ответ с высоким уровнем секреции иммуноглобулина класса IgA, который обнаруживается в слизистых секретах.

Теоретически мукозальные вакцины обладают важным свойством, которое не обнаружено у парентеральных препаратов, — они создают местный иммунный ответ и таким образом защищают не только от болезни, но и предупреждают развитие инфекционного процесса на слизистых (колонизацию), что ведет к уменьшению (или прекращению) горизонтальной передачи патогена от носителя к чувствительному субъекту. Предполагается, что именно мукозальные вакцины станут основным инструментом в профилактике и, возможно, глобальной элиминации дифтерии, а также в борьбе с инфекциями, вызываемыми стрептококками группы В, гемофильной палочкой, клебсиеллой.

Основной сложностью применения мукозальных вакцин является необходимость усиления иммунного ответа на протективный антиген с помощью специальных адъювантов.

В семейство мукозальных адъювантов входят бактериальные токсины, бактериальные липопептиды, мукопептиды, липополисахарид и его производные, короткие олигонуклеотиды бактериальной ДНК, гидроокись алюминия, фосфат алюминия, сапонин и ряд цитокинов.

Весьма подробно изучены адъювантные свойства бактериальных токсинов, прежде всего термолabile токсина (Lt) *E. coli* и холерного токсина (СТ). Эти токсины состоят из 2 субъединиц: А-субъединицы, обладающей ферментативной активностью, и В-субъединицы, связывающей гликолипиды рецепторов. Используя метод сайт-направленного мутагенеза, в ряде лабораторий мира получены более 50 различных, не токсичных для человека и живот-

ных, мутантных форм токсина LT, имеющих свойства адьювантов. Из всех этих мутантных форм токсина наиболее изучены 2: LTK63, содержащий 1 мутацию в А-субъединице и полностью утративший ее ферментативную активность, и LTK72, который такую активность сохранил только частично. Эти рекомбинантные формы токсина обеспечивают индукцию иммунного ответа на вирусные, бактериальные и синтетические пептиды при совместном введении на мукозальные поверхности у различных видов животных (мыши, кролики, морские свинки, минисвиньи). Изучение иммунного ответа в этих экспериментах показало, что такие адьюванты индуцируют не только СЭ4 + Т-клетки, но СО8 + цитотоксические лимфоциты специфические для вводимого антигена. Кроме того, если LTK63 усиливает Th-1- и Th-2-ответ, то LTK72 усиливает Th-2-ответ и супрессирует Th-1-ответ. Показано, что LTK63, в отличие от LTK72, усиливает продукцию IL-12, TNF- α и транслокацию NF κ B. Уже начаты клинические исследования субъединичной назальной вакцины против гриппа, содержащей также мутантный адьювант LTK63. Есть все основания предполагать, что использование данного подхода может оказаться полезным для создания не только вакцин против респираторных инфекций, но и местных вакцин против некоторых венерических заболеваний и ВИЧ. Появление таких вакцин можно ожидать уже к 2010 г.

Весьма большие надежды возлагают на иммуностимулирующий комплекс (ISCOM). Особого внимания заслуживает адьювант MF59.

Транскожная иммунизация

Метод основан на гипотезе, согласно которой доставка антигена непосредственно в расположение дендритных клеток позволит усилить системный иммунный ответ. Метод находится в стадии экспериментальной разработки. Изучается его эффективность на примере ДНК-вакцин, для введения препарата используют метод *gene-gun* (частицы золота, несущие на своей поверхности антиген, в струе гелия под давлением внедряются в кожу). Рассматриваемый способ введения сопровождается развитием Th-2-ответа. При инъекции ДНК-вакцины формируется преимущественно Th-1-ответ.

Использование метода *gene-gun* приводит в основном к трансфекции 2 типов клеток: белых отростчатых эпидермоцитов (клетки Лангерганса) и кератиноцитов. Трансфицированные кератиноциты в дальнейшем выполняют функцию "фабрики" по производству антигена, а трансфицированные клетки Лангерганса после миграции в регионарные лимфатические узлы участвуют в презентации антигена. Кроме этого, презентировать антиген могут и не трансфицированные клетки Лангерганса, которые захватывают антиген, экспрессированный кератиноцитами или другими клетками кожи, мигрируют в лимфоузел и обеспечивают включение Т-клеточных реакций.

Вакцины на основе рекомбинантных белков, воспроизводимых в растениях (синонимы — растительные, съедобные вакцины)

Описаны 2 приема получения рекомбинантных белков в растениях:

1. Временная экспрессия, достигаемая путем введения модифицированного вируса, который несет ДНК, кодирующую протективный белок.
2. Стабильная трансформация генома растения. Такое трансгенное растение способно при выращивании синтезировать протективный антиген, который накапливается в плодах, корнях, листьях и стеблях, т. е. в съедобных частях этого растения. Для получения растительных вакцин используют табак, помидоры, картофель, бананы. В последнее время большое внимание уделяется маису.

Получены следующие растения: 1) трансгенный картофель, в котором синтезируются капсидные белки вируса гепатита В, антигены термолabileного энтеротоксина *E. coli*; 2) трансгенные помидоры как система для получения антигенов ВИЧ, вируса гепатита В, субъединицы В холерного токсина, ротавирусов, вируса *Norwalk*; 3) трансгенный табак, в листьях которого содержатся антигены вируса кори и гепатита В; 4) трансгенный маис — источник рекомбинантной субъединицы термолabileного энтеротоксина *E. coli*; 5) трансгенные бананы, содержащие рекомбинантные бактериальные антигены.

Иммунологическая эффективность рекомбинантных бактериальных и вирусных антигенов, полученных в трансгенных растениях, продемонстрирована в опытах на мышах и в ряде случаев — на людях (энтеротоксин *E. coli* HBsAg, антигены вируса *Norwalk*).

Декларируется серия преимуществ растительных вакцин по сравнению с классическими иммунопрофилактическими препаратами: безопасность, экономичность, высокая технологичность, развитие массового производства без крупных инвестиций.

Пока остается много вопросов, без ответа на которые трансгенные растения (ТР) — продуценты протективных антигенов — не смогут войти в практику:

1. Какова генетическая стабильность ТР, синтезирующих чужеродные антигены; каково влияние этих растений на растения того же вида, и возможно ли распространение ТР естественным путем; меняется ли пищевая или иная ценность овощей, фруктов и других плодов, полученных от ТР?
2. Не нарушат ли трансгенные вакцины кишечную толерантность к пищевым аллергенам?
3. Как законодательно исключить неконтролируемое выращивание и распространение трансгенных растений — продуцентов чужеродных антигенов?

По-видимому, в ближайшие годы работы по получению рекомбинантных белков в трансгенных растениях не выйдут за пределы экспериментов на животных и ограниченных испытаний на людях.

Перечень новых и усовершенствуемых вакцин. Характеристика. Этапы разработки

Возбудитель	Характеристика кандидата в вакцины	Экспериментальная разработка	Стадия испытания			
			Доклиническая	Клиническая фаза		
				I	II	III
<i>Ancylostoma duodenale</i>	Рекомбинантный белок	+	+			
<i>Bacillus anthracis</i>	Рекомбинантные субъединицы	+	+			
<i>Bordetella pertussis</i>	Поверхностный белок, экспрессируемый живым вектором (<i>Salmonella</i> , <i>Vibrio cholerae</i>)	+	+			
	Рекомбинантный коклюшный токсин (КТ)	+	+	+	+	+
	Очищенный КТ и филаментозный антиген (ФАГ)	+	+	+	+	+
	Очищенные КТ, ФАГ агглютиногены 2, 3	+	+	+	+	+
	Очищенные КТ, ФАГ Пертактин	+	+	+	+	+
	Рекомбинантные КТ, ФАГ Пертактин	+	+	+	+	+
	АКДС + Hib (конъюгат)	+	+	+	+	+
	АКДС + Hib + вакцина против гепатита В (ВГВ)	+	+	+	+	+
	АКДС + инактивированная полиовакцина (ИПВ)	+	+	+	+	
	АКДС + Hib + ВГВ	+	+	+	+	
	АКДС с бесклеточным коклюшным компонентом (АКБДС)					
	АКБДС + Hib + ИПВ + ВГВ	+	+	+	+	
	АКБДС + Hib	+	+	+	+	+
	АКБДС + Hib + ИПВ	+	+	+	+	
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Очищенный белок	+	+			
	Рекомбинантный белок	+				
	Аттенуированный штамм	+	+			
<i>Burrelia burgdorferi</i>	Рекомбинантный белок OspA	+	+	+	+	+
	ДНК-вакцина	+	+			
	Рекомбинантный белок OspA, экспрессируемый BCG	+	+			
	Очищенные белки OspB, OspC	+	+	+		
<i>Calicivirus</i>	Воспроизведенные в трансгенном картофеле вирусные белки	+	+	+		
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Очищенные белки наружной мембраны и белки теплового шока	+				
	ДНК-вакцина	+				
<i>Clostridium difficile</i>	Инактивированные формалином токсины типа А и В+	+	+	+		
<i>Clostridium tetani</i>	Рекомбинантный токсин	+	+			
	<i>Salmonella</i> , экспрессирующая рекомбинантный токсин	+	+	+		
<i>Candida albicans</i>	Олигоманнозный эпитоп клеточной стенки	+	+			
Чикунгунья вирус	Аттенуированный штамм	+	+	+	+	
<i>Coccidioides immitis</i>	Инактивированные формалином сферулы	+	+	+	+	+
	Рекомбинантные белки	+	+			
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Рекомбинантный токсин	+	+			
	<i>Salmonella</i> , экспрессирующая рекомбинантный токсин	+	+	+		
<i>Coxiella burnetti</i>	Инактивированные формалином риккетсии	+	+	+	+	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Частично очищенный капсульный полисахарид (КПС)	+	+			
	КПС, конъюгированный со столбнячным анатоксином	+	+	+		
Цитомегаловирус	Аттенуированный штамм	+	+	+	+	
	Генноинженерный аттенуированный штамм	+	+			
	Субъединичная гликопротеиновая вакцина	+	+	+	+	
	ДНК-вакцина	+	+			
Вирус Денге	Рекомбинантные вирусные белки	+	+			
	Инактивированный формалином вирус	+	+	+		
	Вирус осповакцины, экспрессирующий рекомбинантные белки	+	+			
	вирусные субъединицы	+	+			
	Бакуловирус, экспрессирующий вирусные субъединицы	+	+			
	Синтетические пептиды	+	+			
	Различные вирусные элементы, включенные в ISCOM	+	+			
	Рекомбинантная вирусная оболочка	+	+			

Приоритетные направления развития науки

Возбудитель	Характеристика кандидата в вакцины	Экспериментальная разработка	Стадия испытания			
			Доклиническая	Клиническая фаза		
				I	II	III
Вирус Денге	Аттенуированный штамм	+	+	+	+	
<i>Entamoeba histolytica</i>	Рекомбинантные субъединицы	+	+			
	Рекомбинантный галактозасвязывающий белок (ГСБ)	+	+			
	<i>Salmonella</i> , экспрессирующая рекомбинантный ГСБ	+	+			
Энтеротоксигенная <i>Escheicha coli</i> (ЗЕС)	Конъюгатинактивированных клеток с β -субъединицей холерного токсина	+	+			
	Нетоксигенный дериват ЭЭС	+	+	+	+	
	Субъединицы анатоксина и термолабильного токсина, экспрессированные в трансгенном картофеле	+	+	+		
Эпштейна–Барр вирус	Гликопротеиновые субъединицы	+	+	+		
	Пептиды	+	+	+		
	Вирус осповакцины, экспрессирующий гликопротеиновые субъединицы	+	+	+		
Эбола вирус	Рекомбинантные субъединицы	+	+			
<i>Fracisella tularensis</i>	Атенуированный штамм	+	+	+	+	
Стрептококки группы А	Конъюгат полисахарида со столбнячным анатоксином	+	+	+		
	Консервативный эпитоп М белка, экспрессируемый <i>S. Gordonii</i>					
Стрептококки группы В	Конъюгат полисахаридов с анатоксинами	+	+	+	+	
	Белки, полученные с помощью геномного метода обратной вакцинологии	+				
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Белки наружной мембраны	+	+			
	Гемолизин + цитокины	+	+			
<i>Haemophilus influenzae</i> (нетипируемая)	Рекомбинантные белки с белковым носителем	+	+			
	Субъединичный липопротеин D	+	+	+		
	Субъединичный детоксицированный ЛПС, конъюгированный со столбнячным анатоксином	+	+			
	Субъединичный детоксицированный ЛПС, конъюгированный с НМВ белком <i>H. influenzae</i> (нетипируемой)	+	+	+	+	
	Белки наружной мембраны	+	+	+	+	
	Пили	+	+			
<i>Haemophilus influenzae</i> тип В (Hib)	Конъюгат полисахарида со столбнячным анатоксином	+	+	+	+	+
	с дифтерийным анатоксином	+	+	+	+	+
	с белком наружной мембраны менингококка серогруппы В	+	+	+	+	+
	Hib + ИПВ + ВГВ	+	+	+	+	+
	Полисахарид, конъюгированный с менингококком типа А или С	+	+	+	+	+
Ханта вирус	Рекомбинантные субъединицы	+				
<i>Helicobacter pylori</i>	Рекомбинантная <i>H. pylori</i> уреазы и холерный токсин	+	+	+		
	Антигены в комбинации с детоксицированными мутантами холерного токсина или термолабильного токсина <i>E. coli</i>	+	+	+		
	Инактивированные микробные клетки	+	+			
Гепатита А вирус	Инактивированный вирус	+	+	+	+	+
	Аттенуированный штамм	+	+	+	+	+
	Инактивированный вирус в составе липосом	+	+	+	+	+
	Вирусные белки, экспрессируемые вирусом осповакцины или бакуловирусом	+	+			
Гепатита В вирус	Коровый протеин, экспрессируемый гДНК	+	+			
	Рекомбинантные белки, экспрессируемые дрожжевыми клетками, в которые встроена гДНК	+	+	+	+	+
	ДНК-вакцина	+	+			
	Белки, экспрессируемые в растениях гДНК	+	+	+		
Гепатита С вирус	Поверхностные белки и эпитопы, экспрессируемые гДНК	+	+			
	ДНК-вакцина	+	+			
Гепатита D вирус	Синтетические пептиды	+	+			
	Белки, экспрессируемые бакуловирусом	+				

Возбудитель	Характеристика кандидата в вакцины	Экспериментальная разработка	Стадия испытания			
			Доклиническая	Клиническая фаза		
				I	II	III
Гепатита Е вирус	Рекомбинантные белки	+	+	+	+	
Герпеса простого вирусы типа 1 и 2	Конъюгат рекомбинантного белка, Т-клеточного эпитопа и пептидов вируса	+	+			
	Гликопротеин, экспрессируемый вирусом осповакцины	+	+			
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Очищенный протеин, синтезируемый дрожжами	+	+			
Папиллома вируса человека	Капсидный белок	+	+			
	Рекомбинантные белки вирусов типа 16 и 18	+	+	+	+	
	вируса типа 6	+	+	+	+	
	вируса типа 11	+	+	+		
	поликомпонентный рекомбинантный белок типа 6, 11, 16, 18	+	+			
	ДНК-вакцина	+	+			
Гриппа вирус	Холодоадаптированный, аттенуированный штамм	+	+	+	+	+
	Очищенный гемагглютинин (ГА)	+	+	+		
	Липосомы с гемагглютинином	+	+	+	+	
	Пептиды с Т-клеточным эпитопом	+	+	+		
	Очищенная инактивированная нейраминидаза	+	+	+		
	ГА, экспрессируемый бакуловирусом	+	+	+	+	
	Нуклеопротеин, экспрессируемый бакуловирусом	+	+	+		
	ДНК-вакцина	+	+			
Японского энцефалита вирус	Инактивированная вакцина с новыми адъювантами	+	+	+	+	
	Цельновиральная инактивированная	+	+	+	+	+
	Аттенуированный штамм	+	+	+	+	
	Рекомбинантный белок	+	+			
<i>Leishmania major</i>	Аттенуированный или инактивированный паразит	+	+	+	+	+
Кори вирус	ГА- и фьюжен-белки, кодируемые гДНК	+	+			
	Рекомбинантные белки и адъювант ISCOM	+	+			
	Аттенуированный штамм	+	+	+	+	+
	Вирус осповакцины, экспрессирующий белки возбудителя кори	+	+			
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Высокомолекулярные белки наружной мембраны, конъюгированные с носителями	+	+			
	Детоксицированный липоолигосахарид, конъюгированный со столбнячным анатоксином или MW-белком нетипируемой <i>H. influenzae</i>	+	+			
Ротавирус	Холодоадаптированный аттенуированный человеческий штамм	+	+	+		
	Вирусные белки, экспрессируемые <i>Salmonella</i>	+	+			
	Рекомбинантные вирусные белки	+	+			
	Рекомбинантные вирусные белки, экспрессируемые вирусом осповакцины	+	+			
Краснухи вирус	Синтетические пептиды	+				
<i>Salmonella typhi</i>	Vi-антиген	+	+	+	+	+
	Аттенуированный штамм Ty21a	+	+	+	+	+
	Аттенуированный ауксотрофный мутант	+	+	+	+	
<i>Schistosoma mansoni</i>	Очищение антигены личинки	+	+			
<i>Schistosoma haematobium</i>	Рекомбинантные антигены личинки	+	+			
<i>Pseudomonax aeruginosa</i>	Очищенные бактериальные белки	+	+	+		
	Инактивированная цельноклеточная вакцина	+	+	+		
	Синтетические пептиды	+	+	+		
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Очищенные бактериальные белки	+				
<i>Pythium insidiosum</i>	Обработанный ультразвуковой антиген	+	+			
	Очищенные белки	+	+			
Бешенства вирус	ДНК-вакцина (ветеринарная)	+	+	+	+	+
Респираторно-синцитиальный вирус	Аттенуированный штамм	+	+	+	+	
	Субъединичная вакцина	+	+	+	+	
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Субъединичная вакцина	+	+			

Возбудитель	Характеристика кандидата в вакцины	Экспериментальная разработка	Стадия испытания			
			Доклиническая	Клиническая фаза		
				I	II	III
Долины Рифт вирус	Цельновирионная инактивированная	+	+	+	+	
	Аттенуированный штамм	+	+	+		
<i>Neisseria meningitidis</i> (группа B)	Природные везикулы внешней мембраны	+	+	+		
	Белки внешней мембраны в липосомах	+	+			
	Белки, полученные методами обратной вакцинологии	+				
	Рекомбинантные низкомолекулярные белки внешней мембраны	+	+			
<i>Neisseria meningitidis</i> (группа C)	Полисахарид, конъюгированный со столбнячным анатоксином	+	+	+	+	
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Рекомбинантные протеины	+	+			
	Синтетические пептиды	+	+			
	ДНК-вакцина	+	+			
<i>Plasmodium falciparum</i>	Пептиды и рекомбинантные белки	+	+	+	+	
	ДНК-вакцины	+	+	+		
	Поливалентная на основе живого вектора, содержащая антигены разных стадий развития паразита	+	+	+	+	
Полиовирус	Неревертирующие аттенуированные вакцинные штаммы Сэбина	+				
<i>Mycobacterium leprae</i>	БЦЖ в смеси с очищенными антигенами <i>M. leprae</i>	+	+			
	БЦЖ, экспрессирующая антигены <i>M. leprae</i>	+	+			
	БЦЖ в смеси с инактивированной теплом <i>M. leprae</i>	+	+	+	+	
	Вирус осповакцины, экспрессирующий лепрозные антигены	+	+			
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	БЦЖ в смеси с очищенными антигенами <i>M. tuberculosis</i>	+	+			
	ДНК-вакцина	+	+			
	Рекомбинантная БЦЖ, секретирующая цитокины	+	+			
	Дендритные клетки, обработанные пептидом	+	+			
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Рекомбинантный, ассоциированный с мембраной протеин	+	+			
	Очищенный протеин наружной мембраны	+	+			
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Цельноклеточная вакцина	+	+			
	ЛПС анти-идиотип	+	+			
<i>Neisseria meningitidis</i> (группа A)	Полисахарид, конъюгированный со столбнячным анатоксином	+	+			
	Липоолигосахарид	+				
<i>Shigella dysenteriae</i>	Живой, аукоотрофный мутант	+	+	+		
	Белково-полисахаридный конъюгат	+	+	+	+	
<i>Shigella flexneri</i>	Белково-полисахаридный конъюгат	+	+	+	+	
	Аттенуированный штамм для перорального применения	+	+	+	+	
	ЛПС в протеосомах	+	+			
<i>Shigella sonnei</i>	Аттенуированный штамм для перорального применения	+	+			
	ЛПС в протеосомах	+	+			
	Белково-полисахаридный конъюгат	+	+	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Капсульный полисахарид типа 5, конъюгированный с рекомбинантным протеином <i>A. P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	
Стафилококковый энтеротоксин типа B	Рекомбинантный анатоксин	+	+			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Полисахариды (1, 4, 5, 6B, 9N, 14, 18C, 19F, 23F), конъюгированные с белком наружной мембраны менингококка группы B	+	+	+	+	
	Полисахариды (3, 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F), конъюгированные с дифтерийным или столбнячным анатоксином	+	+	+	+	
	23-валентная лицензированная вакцина, конъюгированная с новыми адъювантами (монофосфорилированный липид А-МФЛ; трипептидный глюкозид – сапонин, фракция <i>Quillaja saponaria</i> – QuilA и т. д.)	+	+	+		
	Поливалентная вакцина, конъюгированная с носителями (анатоксинами и т. д.) в комбинации с новыми адъювантами (МФЛ, сапонины, QuilA и т. д.)	+	+	+		
	Аутолизин	+	+			
	Нейраминидаза	+	+			
	11-валентная вакцина, конъюгированная с белком наружной мембраны нетипируемой <i>H. influenzae</i>	+	+	+	+	

Возбудитель	Характеристика кандидата в вакцины	Экспериментальная разработка	Стадия испытания			
			Доклиническая	Клиническая фаза		
				I	II	III
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Комбинация синтетических пептидов с капсулярным полисахаридом	+	+			
Клещевого энцефалита вирус	ДНК-вакцина	+	+			
	Инактивированная цельновирионная с гидроокисью алюминия	+	+	+	+	
<i>Toxoplasma gondii</i>	Рекомбинантные поверхностные белки	+	+			
	Аттенуированный штамм	+	+			
	Рекомбинантные белки, экспрессируемые вирусным вектором	+	+			
<i>Treponema pallidum</i>	Поверхностные липопротеины	+	+			
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Рекомбинантные пептиды	+	+			
Опоясывающего герпеса вирус	Аттенуированный штамм	+	+	+	+	+
	Субъединичные гликопротеины	+				
	Рекомбинантные гликопротеины, секретируемые вирусом осповакцины	+				
Венесуэльского лошадиного энцефаломиелита вирус	Цельновирионная инактивированная вакцина	+	+	+	+	
<i>Vibrio cholerae</i>	Аттенуированный штамм	+	+	+	+	
	Инактивированные бактериальные клетки в сочетании с В-субъединицей холерного токсина	+	+	+	+	+
	Живая рекомбинантная 01	+	+	+	+	+
	Живая рекомбинантная 0139	+	+	+	+	
Желтой лихорадки вирус	Аттенуированный штамм	+	+	+	+	+
Западного лошадиного энцефалита вирус	Цельновирионная инактивированная вакцина	+	+	+	+	
<i>Yersinia pestis</i>	Рекомбинантные субъединицы	+	+			

Экономические аспекты вакцинопрофилактики. Обсуждаемые пути повышения рентабельности вакцинации

В настоящее время общепризнано, что вакцинопрофилактика дает высокий экономический эффект и значимые социальные результаты.

Экономический эффект исчисляют, сравнивая затраты на 1 прививку (стоимость вакцины, процедуры прививок, лечения побочных эффектов) со стоимостью лечения 1 случая заболевания (стоимость лабораторной диагностики, посещения врача, пребывания в больнице, использованных лекарственных средств). Для АКБДС-вакцины и комбинированной живой вакцины против кори, паротита, краснухи соотношение этих затрат равно 1 : 24, а для вакцины против гриппа — 1 : 14.

При определении социального эффекта исчисляют стоимость продукции, которую мог бы произвести человек за год, потерянный в результате болезни. В США эта величина для новорожденных равна 103 долл., для подростков — 7 902 долл., для взрослых до 50 лет — 230 тыс. долл. Несмотря на высокую экономическую и социальную эффективность вакцинопрофилактики, вакцинный бизнес рассматривается как малорентабельный. В денежном исчислении годовой продукт этого рынка составляет всего 2 % от фармацевтического продукта. Низкую рентабельность вакцинации объясняют непрерывным увеличением стоимости цикла идея—разработка—лицензия. В 2003 г. цена цикла достигла 750 млн долл.

Прогнозируется, что она в ближайшие 2—3 года увеличится до 1 млрд долл., а затем достигнет 1,25 млрд долл. Рост затрат на разработку и освоение обусловлен постоянным повышением требований стандартов безопасности и проведения клинических испытаний.

Наметилось несколько путей снижения затрат на вакцинопрофилактику. Наиболее перспективным считают увеличение доли бюджетного финансирования путем постепенного расширения календаря прививок (включенные в него вакцины оплачивает государство). В 2004 г. Министерство здравоохранения и социального развития РФ выступило с предложением включить в календарь прививок вакцинацию против гриппа группы риска. Начаты работы по привлечению страховых компаний к финансированию затрат на вакцинопрофилактику. В настоящее время в 21 государстве компании оплачивают прививки против гриппа. В последние годы стали использовать критерии экономической оптимизации состава вакцин (включение вакцины против гепатита В в АКДС-вакцину). Перспективным представляется увеличение выпуска терапевтических вакцин, поскольку они по своим потребительским характеристикам приближаются к фармпрепаратам.

Обобщенный прогноз развития вакцинологии до 2020 года

1. Применение вакцин будет возрастать за счет расширения календаря прививок, использования

- вакцин для профилактики соматических заболеваний (инфаркта, инсульта, инсулинозависимого диабета и т. д.), применения вакцин в рамках комплексной терапии хронической патологии (ВИЧ-инфекция, гепатит В, герпес, послеоперационные воспалительные процессы и т. д.); создания вакцин для профилактики и иммунотерапии онкологических процессов.
2. В рамках среднесрочного прогноза в качестве приоритетных целей называют создание вакцин для профилактики ВИЧ-1-инфекции, малярии и гепатита С; разработку вакцин против неизвестных патогенов (защита от биологической опасности) и конструирование вакцин для иммунопрофилактики и иммунотерапии онкологических заболеваний.
 3. Долгосрочный прогноз ставит задачу разработать и лицензировать вакцины против всех известных инфекций, даже против тех, которые в настоящее время не актуальны для человека, поскольку в любой момент они могут превратиться в глобальную проблему, подобно инфекции, вызываемой вирусом птичьего гриппа, который рассматривается в настоящее время как кандидат в возбудители пандемии гриппа.
 4. Для усовершенствования существующих и создания новых вакцин будут использоваться методы классической вакцинологии и методы, основанные на достижениях геномики и протеомики (ДНК-рекомбинантные технологии, технологии обратной вакцинологии и технология обратной транскрипции).
 5. Признано, что продукты геномных технологий обладают недостаточной иммуногенностью, т. к. они лишены патоген-ассоциированных молекулярных структур, распознавание которых системой врожденного иммунитета является обязательным условием для формирования приобретенного иммунитета. Поэтому продукты геномных технологий должны комбинироваться с адьювантами нового поколения.
 6. Создание и лицензирование адьювантов нового поколения, пригодных для применения человеком, рассматривается как необходимое условие конструирования эффективных вакцин на основе генетических технологий.
 7. Продолжаются исследования по комплексной оценке безопасности ДНК-вакцин и вакцин на основе трансгенных растений — продуцентов протективных антигенов. Только после завершения этих исследований будет принято решение о возможности применения названных препаратов в практике.
 8. Ожидается расширение работ по созданию вакцин, стимулирующих быстрое формирование неспецифической резистентности за счет активации системы врожденного иммунитета (защита от биологической опасности неизвестной этиологии).
 9. Использование технологии обратной транскрипции при создании кандидатов в посевные штаммы для пандемической вакцины против гриппа.
 10. При создании вакцин против приоритетных и злокачественных инфекций предполагается комбинация методов обратной вакцинологии с методами активации системы врожденного иммунитета.
 11. Разработка терапевтических вакцин пойдет в нескольких направлениях: использование генетических технологий для конструирования препаратов; существенное расширение сферы применения (ВИЧ-инфекция, аутоиммунные процессы, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз), получение аутологичных (индивидуальных) противораковых вакцин на основе дендритных клеток, представляющих опухоль-ассоциированные антигены Т-клетками.
 12. Ожидается внедрение в практику нового поколения средств для иммунотерапии аллергии (аллерготропинов) на основе полимерного адьюванта полиоксидония.
 13. Предполагается завершение работы по созданию и лицензированию вакцин, защищающих взрослых женщин от вирусов, которые ассоциируются со злокачественными процессами в половых органах (вирус простого герпеса типа 2, некоторые типы вируса папилломы), и от вирусов, вызывающих патологию плода (цитомегаловирус).
 14. Будут разрабатываться непарэнтеральные (неинъекционные) вакцины (мукозальные — оральные, назальные; транскожные). Применение таких препаратов повысит безопасность массовой вакцинопрофилактики и сделает ее более приемлемой для населения. Предполагается, что непарэнтеральная иммунизация окажется более эффективной по сравнению с инъекционной.
 15. Признается высокая экономическая эффективность вакцинации при сравнении стоимости 1 прививки и лечения 1 непредупрежденного случая (1 : 24 — для АКБДС). Однако рентабельность вакцинного производства значительно ниже, чем рентабельность фарминдустрии. В условиях возрастающих требований стандартов GMP и клинических испытаний стоимость цикла от идеи до лицензии в 2003 г. составляла 850 млн долл. Ожидается в ближайшие 5 лет увеличение этой цифры до 1 млрд долларов.
 16. Для повышения экономической эффективности вакцинопрофилактики предлагают последовательно увеличивать долю бюджетных ассигнований при закупке вакцин путем расширения финансируемого государством календаря прививок; использовать вакцинацию страховым бизнесом для снижения рисков клиентов, снижать стоимость вакцин и уменьшать затраты на проведение прививок, внедряя экономический анализ в теоретическую и прикладную вакцинологию.

Приоритетные для России фундаментальные исследования и прикладные разработки в области вакцинологии

1. Исследование клеточных и молекулярных механизмов активации врожденного иммунитета при формировании антиинфекционного и противоопухолевого иммунитета.
2. Экспериментальная разработка и клиническая апробация адъювантов нового поколения для потенцирования иммуногенности генноинженерных продуктов.
3. Получение методами обратной вакцинологии кандидатов в вакцины против ВИЧ-инфекции, инфекции вируса гепатита С и менингококковой инфекции типа В.
4. Использование метода обратной транскрипции при получении посевного штамма из актуальных штаммов вируса птичьего гриппа для конструирования пандемической гриппозной вакцины.
5. Создание нового поколения средств для иммунотерапии рака (аутологичные дендритные вакцины), аллергологии (аллерготропины) и послеоперационных инфекционных осложнений (бактериальные иммуномодуляторы, пробиотики).
6. Разработка иммунобиологических средств для экстренной защиты от неизвестных патогенов.
7. Создание календаря прививок для непарентерального введения (назальное, оральное, транскожное).

8. Разработка и внедрение в практику бесклеточной коклюшной вакцины с последующим включением ее в состав АКДС-вакцины.
9. Разработка и внедрение в практику новой инактивированной вакцины против полиомиелита.

Литература

1. *Hilleman J., ed.* The Jordan report 20-th anniversary. Accelerated development of vaccines 2002. Washington: Department of health and human services; National institutes of health; 2002.
2. *Grandi G., ed.* Genomics, proteomics and vaccines. Chichester: John Wiley & Sons. Ltd; 2004.
3. *Kaufmann S.H.E., ed.* Novel vaccination strategies. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2004.
4. National immunization program, Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/nip/default.htm>
5. National Vaccine Program Office, Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/od/nvpo/>
6. World Health Organization (WHO). http://www.vvho.int/health_topics/vaccines/en/
7. Global Alliance for Vaccines and Immunization (GAVI). <http://www.VaccineAlliance.org>
8. Children's vaccine program. <http://www.childrensvaccine.org>
9. Immunization Action Coalition. <http://www.immunize.org>
10. Vaccine page. <http://www.vaccines.org>

Поступила 15.06.05
© Коллектив авторов, 2005
УДК 615.371.012.6