

А. Л. АЛЕКСЕЕВА, А. И. НЕУМЕСТОВА, М. А. ЗЕНКОВА

Вирисомы: старая форма, новое содержание

Природа создала множество биологических наноустройств и наномашин, элементы которых могут быть перепрограммированы для решения задач современной биологии и медицины. Одна из областей их применения – биофармацевтика. Молекулы белка, ДНК, РНК и их комплексы успешно применяются для конструирования терапевтических препаратов и вакцин. Это основа медицины будущего, которая будет базироваться на применении интеллектуальных лекарств, избирательно действующих на инфекционные агенты или на биополимеры, определяющие функционирование клеток человека

Ключевые слова: вирисомы, оболочки вирусов, вакцины, адресная доставка, вирус гриппа.

Key words: virosomes, virus envelope, vaccines, targeted delivery, influenza virus

© А. Л. Алексеева, А. И. Неуместова, М. А. Зенкова, 2017



АЛЕКСЕЕВА Анастасия Леонидовна – аспирантка, сотрудница лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск), Автор и соавтор 4 научных работ



НЕУМЕСТОВА Александра Ильинична – аспирантка, сотрудница лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск)



ЗЕНКОВА Марина Аркадьевна – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 252 научных работ и 18 патентов

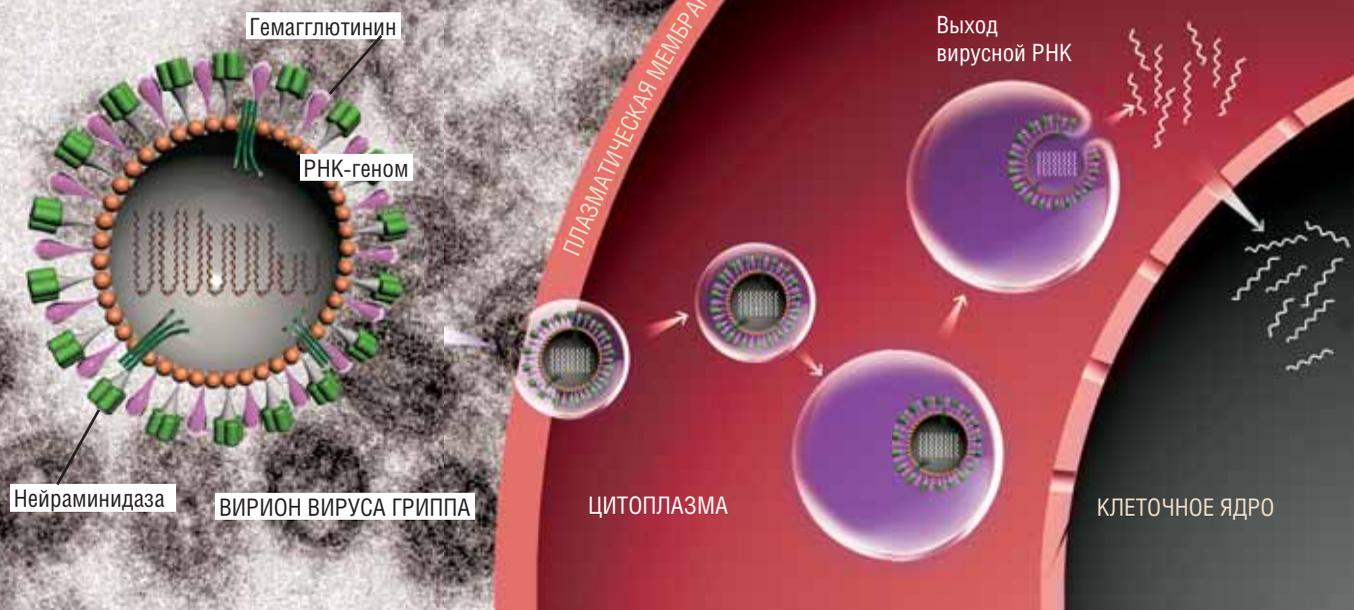
Вирусам, как важнейшему и хорошо изученному классу биологических нанообъектов, уже нашлось применение в прикладной медицине и разного рода фундаментальных исследованиях. Модифицируя вирусные геномы, ученые получают инфекционные агенты, избирательно поражающие раковые клетки; «ослабленные» вирусные частицы используют как живые вакцины; бактериофаги (вирусы – убийцы бактерий) – применяются в сельском хозяйстве, медицине и пищевой промышленности в качестве препаратов для борьбы с инфекциями. На основе генетического материала вирусов разработаны биотехнологические системы для наработки больших количеств белков в бактериях и культурах клеток. Элементы вирусной структуры все шире применяются для создания аналитических устройств, материалов для электроники и средств терапии.

Широкое использование вирусов обусловлено их уникальным строением и образом жизни: они полностью инертны вне организма хозяина и не имеют клеточного строения. Структура их генома очень разнообразна: вирусы могут содержать одну или несколько

молекул РНК или ДНК, которые могут принимать линейную, кольцевую или сегментированную форму.

Роль клеточного ядра, защищающего геном вируса, выполняет *капсид*, состоящий из структурных белков и ферментов. Более сложно организованные вирусные частицы могут иметь дополнительные оболочки – *суперкапсиды*. Эти липопротеидные структуры включают в себя *гликопротеины* – белки, взаимодействующие с поверхностными клеточными рецепторами, что обеспечивает проникновение вирусов внутрь заражаемой клетки. Вирус может содержать более одного типа гликопротеинов, например, у вируса гриппа их два: *гемагглютинины* и *нейраминидаза*.

Избирательное проникновение вирусов в клетки играет важную роль в их выживании. Вирион прикрепляется только к «подходящей» клетке, способной обеспечить его размножение. Проникновение вирусов в клетку может происходить по разным сценариям. Например, *вирус иммунодефицита человека* (ВИЧ-1), инфицируя клетку, сливается своей оболочкой с плазматической мембраной клетки и сразу попадает в цитоплазму. Альтернативный способ, который использует



На поверхности липидной оболочки вируса гриппа располагаются два типа гликопротеинов – гемагглютинины и нейраминидаза. Вирусная частица прикрепляется к клетке путем формирования комплекса между молекулами гемагглютининов и сиаловой кислоты на поверхности клетки, а затем проникает внутрь нее путем эндоцитоза – впячивания мембраны и формирования пузырьков. Высвобождение вирусной РНК из везикулы происходит при снижении рН внутри нее до значения 5.0. В результате мембрана вируса сливается с эндосомальной мембраной, и генетический материал выходит наружу и проникает в ядро клетки. По: (Рябчикова, 2009)

вирус гриппа, *эндоцитоз*, один из естественных процессов, которые клетка использует при захвате вещества из внешней среды.

Природные наноконтейнеры

Вirosомы можно использовать в качестве контейнеров для доставки лекарственных препаратов в клетки. Известно, что зачастую терапевтический потенциал лекарств, показанный ими в условиях «пробирки», не всегда может быть полностью реализован в организме из-за трудностей их транспортировки в клетки или преждевременной деградации в кровотоке. Для решения этих проблем пытались применять *липосомы* – искусственные липидные пузырьки, однако производить устойчивые липосомы, способные взаимодействовать только с определенными клетками, пока не научились. Так возникла идея решить эту проблему с помощью *вirosом* – вирусных частиц, освобожденных от генетического материала, но содержащих поверхностные гликопротеины. Подобные частицы обладают важным свойством: сохраняют способность избирательно свя-

зываться с определенными клетками, доставляя в них свое содержимое.

Возможность доставки лекарственных средств с помощью *вirosом* была показана на примере подавления синтеза белков вируса гепатита С в организме животных. В *вirosомы*, сделанные на основе *вируса Сендай*, заключили короткие шпилечные РНК, способные ингибировать наработку белка вируса гепатита С в зараженных клетках. В результате внутривенного введения такого препарата удалось эффективно снизить количество исследуемого вирусного белка в клетках печени больных мышей (Subramanian *et al.*, 2009).

В некоторых случаях *вirosомы* необходимо «перепрограммировать» таким образом, чтобы нацелить их на определенные типы клеток. Эта задача становится особенно актуальной, когда речь идет о доставке лекарственных средств, провоцирующих клеточную гибель. В этом случае ошибки недопустимы.

Гликопротеины вируса гриппа можно ингибировать полиэтиленгликолем, после чего присоединить белки, способные специфично связываться только с определенными типами раковых клеток. В такой ситуации



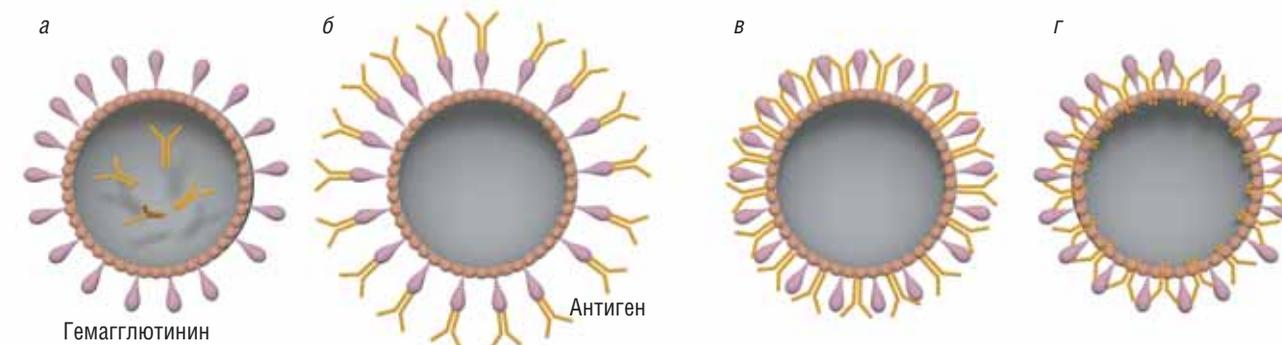
Для получения *вirosом* вирусные частицы разлагают на составляющие компоненты с помощью неионных детергентов, эффективно разрушающих межлипидные и липид-белковые связи и, как правило, не нарушающих структуру белков. Генетический материал вируса удаляют из раствора с помощью скоростного центрифугирования (около 100 000 g). При удалении детергента из оставшегося раствора происходит самосборка вирусной оболочки с сохранением первоначального набора белков. Для включения в *вirosомы* лекарства его добавляют в раствор до удаления детергента. Один из подходов для включения макромолекул – проведение нескольких циклов замораживания-оттаивания *вirosом*, при которых идет захват материала из раствора. Можно модифицировать липидную мембрану *вirosом* (например, вводя холестерин), что повышает ее устойчивость, или присоединить к ней адресующие молекулы

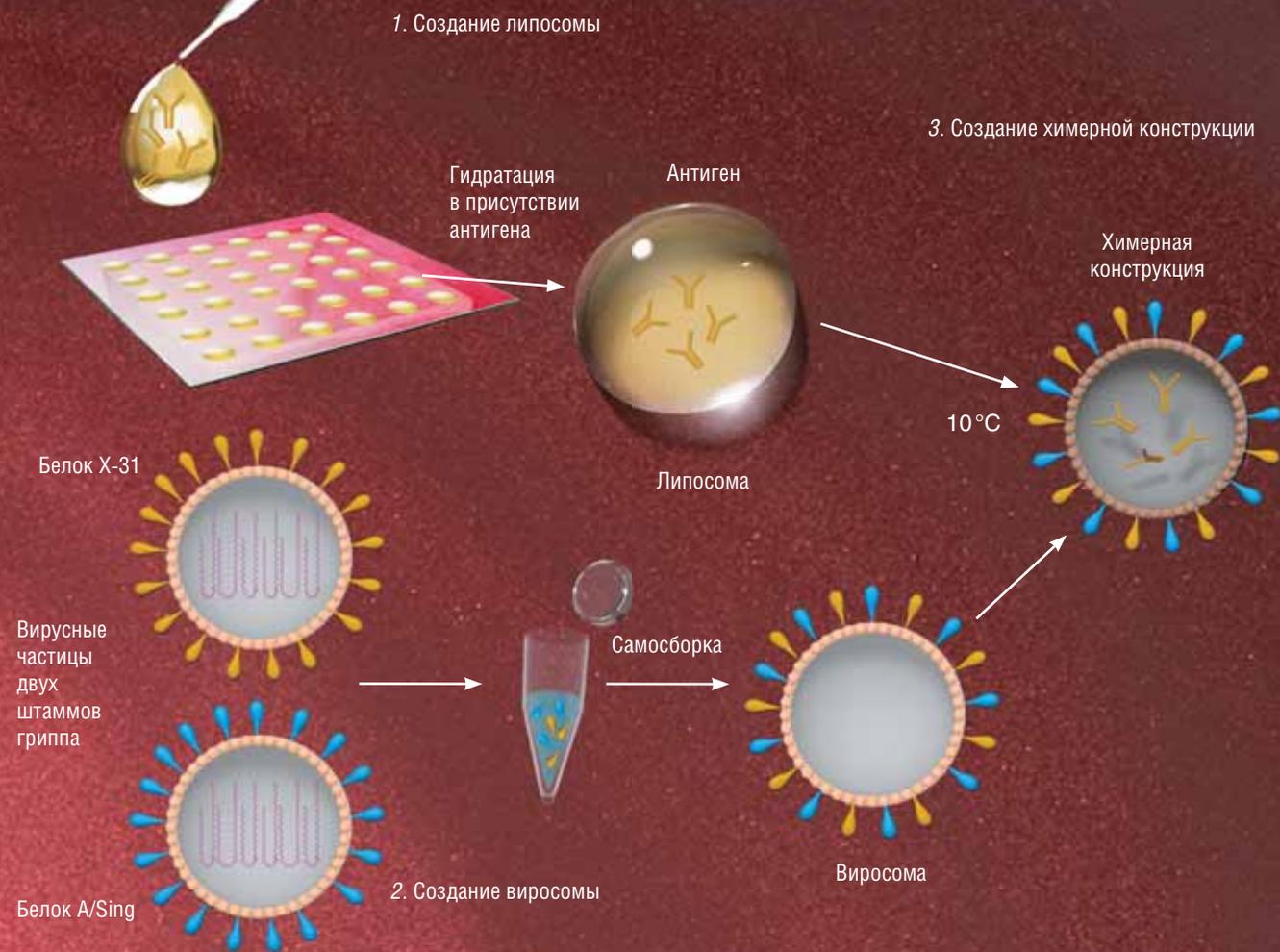
Безопасные вакцины

вirosомы будут доставлять свое содержимое только в эти клетки-мишени. Пример удачного изменения специфичности *вirosом* – это «перепрограммирование» *вirosом* на основе вируса гриппа на эффективное слияние с клетками карциномы яичников (Mastrobattista *et al.*, 2001).

Вirosомы, несущие в себе или на своей поверхности *антигены* (структурные компоненты патогенных микроорганизмов, провоцирующие иммунную реакцию в организме), могут играть роль вакцин и способствовать наработке в организме реципиента клеток иммунологической памяти Т- и В-лимфоцитов. В отличие от «живых вакцин», когда реципиенту вводят ослабленные вирусные частицы с инактивированным генетическим

Наиболее часто вакцинные препараты на основе *вirosом* конструируют из вируса гриппа. Причина – способность его белков-гемагглютининов связываться с молекулами сиаловой кислоты на поверхности антигенпрезентирующих клеток иммунной системы. Главная функция этих клеток – захват и презентация чужеродных белков лимфоцитам, отвечающим за развитие иммунного ответа и последующее формирование иммунологической памяти в организме. Если *вirosома* будет содержать такой чужеродный антиген, он также попадет в антигенпрезентирующие клетки, и в организме может сформироваться устойчивая защита от патогена. *Внизу* – варианты размещения антигена в *вirosомах* на основе вируса гриппа: *а* – внутри *вirosомы*; *б* – в комплексе с гемагглютинином; *в* – адсорбированные на мембране; *г* – погруженные в липидный слой





При создании виросом против вируса гепатита С исследователи предложили намного более эффективный метод включения макромолекул, чем использование детергентов с последующим замораживанием-оттаиванием. Согласно этому методу, антиген сначала вводят в липосому. Для этого липиды «высушивают» до состояния «сухой пленки», а затем проводят их гидратацию («размачивают») в присутствии антигена. В результате путем самосборки образуются липидные пузырьки, содержащие нужный антиген (1). Виросомы создают из вирусных частиц с использованием неионных детергентов, включая в них поверхностные белки-гемагглютинины двух штаммов вируса гриппа – X-31 и A/Sing, имеющие разный температурный диапазон активности (2). X-31 активны при низких (<math><20\text{ }^\circ\text{C}</math>) температурах и способны сливаться с липосомами, на поверхности которых отсутствует сиаловая кислота. Так образуется химерная конструкция, содержащая антиген (3). Гемагглютинины A/Sing, активные при температуре выше $25\text{ }^\circ\text{C}$, обеспечивают слияние химерных виросом с мембраной антигенпрезентирующих клеток в организме (Amacker *et al.*, 2005)

материалом, вакцинация виросомами не несет риска случайного заражения пациента.

Виросомы можно использовать не только для профилактики, но и для лечения таких заболеваний, как, например, гепатит С. Предполагают, что основную роль в борьбе с этой инфекцией играют цитотоксические CD8^+ Т-лимфоциты: эти клетки являются «профессиональными убийцами» внутриклеточных паразитов, недостижимых для системы гуморального иммунитета. «Увидев» антиген на мембране

антигенпрезентирующих клеток, CD8^+ Т-лимфоциты взаимодействуют с ним своими рецепторами, после чего созревают, активируются и уничтожают зараженные клетки. Для активации Т-клеточного иммунного ответа антиген должен попасть в антигенпрезентирующие клетки, и роль его носителя могут сыграть виросомы (Zubriggen & Gluck, 1999).

Виросомы могут применяться в качестве вакцин не только против вирусов, но и других патогенов. Так, у мышей происходит наработка антител против

возбудителя малярии после введения им виросом на основе вируса гриппа, несущих на поверхности синтетические пептиды, соответствующие фрагментам белков плазмодия (Okitsu *et al.*, 2008). Эффективные вакцинирующие препараты были разработаны на основе виросом, содержащих дифтерийный и столбнячный токсины. Сравнение действия таких препаратов и анатоксинов (токсинов, вызывающих иммунный ответ, но не проявляющих токсикологических свойств и служащих традиционными вакцинами против дифтерии и столбняка) показало, что в первом случае антитела нарабатываются более эффективно (Zubriggen & Gluck, 1999).

Виросомы можно использовать и для иммунотерапии онкологических заболеваний – доставки в опухоль ассоциированных с раком антигенов в виде плазмидной ДНК или коротких пептидов. Такие виросомы способны активировать клетки иммунной системы даже более эффективно, чем антиген в нативном виде. В экспериментах на животных было показано, что антиген, специфичный для клеток меланомы Melan-A, доставляемый в виросомах на основе вируса гриппа, успешно проникает в *плазматические дендритные клетки* иммунной системы (популяция антигенпрезентирующих клеток крови). В результате происходит более эффективная активация Т-клеток, способных уничтожить раковые клетки, чем при введении свободного пептида. Этот эффект, по-видимому, обусловлен хорошей защищенностью антигена, находящегося в виросомах (Angel *et al.*, 2007).

Среди отечественных аналогов виросомных вакцин против вируса гриппа следует упомянуть вакцину «Грифор», разработанную на базе НПО «Микроген» (Москва) и официально разрешенную к медицинскому применению на территории РФ в 2008 г. К отечественным противогриппозным вакцинам нового поколения относится препарат «Ультрикс», эффективный в том числе в отношении свиного гриппа (Шамшева и др., 2014).

На сегодняшний день в мире можно выделить несколько групп, занимающихся доставкой терапевтических нуклеиновых кислот, в том числе и *малых интерферирующих РНК* (siRNA), в клетки млекопитающих с помощью виросом (de Jonge *et al.*, 2006). Основные затруднения, с которыми приходится сталкиваться при приготовлении таких виросомных препаратов, связаны с эффективностью включения препарата в состав виросом, а также адресной доставкой в определенные типы клеток. Сегодня в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск) ведутся работы по получению виросом стандартного качества со стабильными свойствами, в том числе обладающих способностью к адресной доставке терапевтических нуклеиновых кислот. Уже разработаны методы включения этих макромолекул в оболочки вируса (Власов и др., 1988, 1989). В дальнейшем планируется создать виросомные препараты, содержащие терапевтические нуклеиновые кислоты, и оценить их воздействие на различные типы раковых клеток человека.

Литература

Власов В.В., Иванова Е.М., Кренделев Ю.Д. и др. Оболочки вируса Сендай и тели эритроцитов – мембранные переносчики для введения реакционноспособных производных олигонуклеотидов в клетки // *Биополимеры и клетка*. 1989. Т. 5. № 4. С. 52–58.

Власов В.В., Кренделев Ю.Д., Овандер М.Н. и др. Эффективный метод включения ДНК в реконструированные оболочки вируса Сендай // *Биополимеры и клетка*. 1988. Т. 4. № 5. С. 250–254.

Шамшева О.В., Ртищев А.Ю. Ультрикс – отечественная вакцина нового поколения // *Педиатрия*. 2014. Т. 93. № 6. С. 121–124.

Angel J., Chaperot L., Molens J. *et al.* Virosome-mediated delivery of tumor antigen to plasmacytoid dendritic cells // *Vaccine*. 2007. V. 25. P. 3913–3921.

de Jonge J., Holtrop M., Wilschut J. *et al.* Reconstituted influenza virus envelopes as an efficient carrier system for cellular delivery of small-interfering RNAs // *Gene Therapy*. 2006. V. 13. P. 400–411.

Okitsu S.L., Mueller M.S., Amacker M. *et al.* Preclinical profiling of the immunogenicity of a two-component subunit malaria vaccine candidate based on virosome technology // *Human Vaccines*. 2008. V. 4 N. 2. P. 106–114.