

# Szczepionki genetyczne i ich zastosowanie w medycynie weterynaryjnej

BEATA MIZAK, RAFAŁ SAWICKI

Zakład Chorób Zwierząt Mięsożernych i Futerkowych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego,  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Mizak B., Sawicki R.

## Genetic vaccines and their application in veterinary medicine

### Summary

Over the last few years a rapid development in the field of genetic vaccines has been observed. This new promising method of prophylaxis of viral, bacterial and parasitic infections is based on the subcutaneous or intramuscular injection of a recombinant fragment of nucleic acid coding immunogenic protein which is ligated into a eucariotic expression vector. In the paper we presented the characteristics of plasmid vectors used for constructing of DNA vaccines, factors determining the immunological response and the possibilities of applying of DNA vaccines in veterinary medicine.

**Keywords:** genetic vaccines, DNA, immunization, plasmid vectors, cloning.

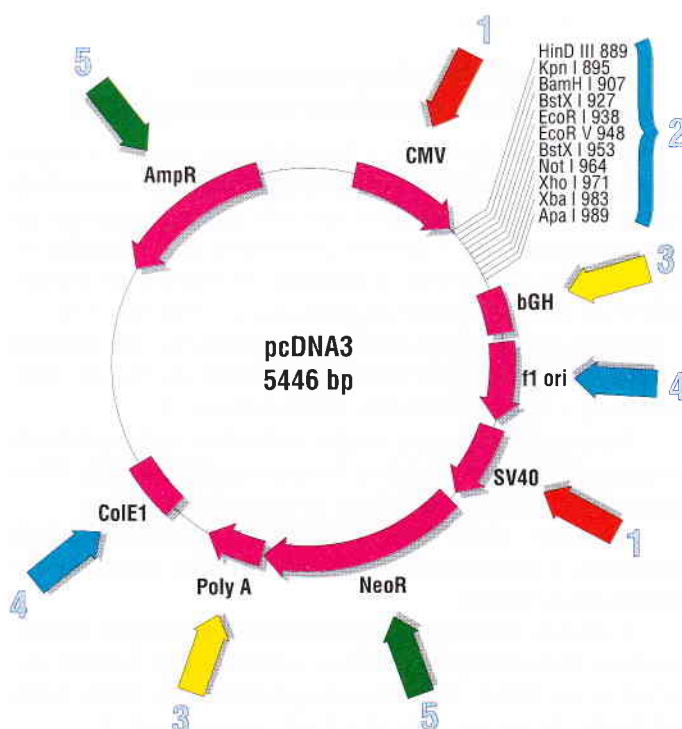
Ostatnie lata przyniosły niezwykle szybki rozwój prac nad szczepionkami genetycznymi, nazywanymi potocznie szczepionkami DNA. Ta nowa i bardzo obiecująca metoda profilaktyki zakażeń wirusowych, bakteryjnych i pasożytniczych polega na podskórnym lub domięśniowym podaniu rekombinowanego fragmentu kwasu nukleinowego kodującego immunogenne białko, zligowanego z plazmidowym eukariotycznym wektorem ekspresyjnym. Odpowiednia konstrukcja plazmidów eukariotycznych, zaopatrzonych m.in. w silny promotor ze wzmacniaczami transkrypcji, terminator transkrypcji i sygnał poliadenylacji, umożliwia wydajną ekspresję wprowadzonych genów i powstanie odpowiedzi immunologicznej zarówno humoralnej, jak i komórkowej, w różnym stopniu nasilenia (13, 14).

### Charakterystyka wektorów plazmidowych używanych do konstrukcji szczepionek genetycznych

W badaniach nad szczepionkami genetycznymi wykorzystywany jest szereg eukariotycznych plazmidów ekspresyjnych, dostępnych w ofercie firm biotechnologicznych. Często wektory te są modyfikowane w celu ich przystosowania do produkcji określonej szczepionki (9, 15). Przykładem wektora ekspresyjnego może być jeden z częściej używanych w pracach nad szczepionkami genetycznymi plazmidów – pcDNA3 (INVITROGEN) (ryc. 1), który jest przeznaczony do klonowania i ekspresji genów w systemach eukariotycznych. W jego skład wchodzi:

1. wczesny promotor cytomegalowirusa (CMV) – sekwencja DNA, z którą wiążą się czynniki transkrypcyjne. Należy on do najwydajniejszych promotorów eukariotycznych. Należy jednak pamiętać, że w konstrukcji

szczepionek genetycznych stosowanie silnych promotorów nie zawsze jest celowe i zależy od rodzaju antygeny. Drugi promotor (wirusa SV40) obecny na plazmidzie, umożliwia ekspresję genu oporności na neomycynę;



Ryc. 1. Schemat eukariotycznego wektora ekspresyjnego pcDNA3 (INVITROGEN)

Objaśnienia: 1 – promotory, 2 – MCS, 3 – sygnały poliadenylacji, 4 – origin replikacji, 5 – markery selekcyjne

2. polilinker (MCS-multi cloning site) – syntetyczna sekwencja DNA kodująca serię miejsc rozpoznawanych przez endonukleazy restrykcyjne. MCS ułatwia klonowanie i orientację insertu w stosunku do promotora;

3. sygnał poliadenylacji – sekwencja oznaczająca miejsce, w którym polimeraza RNA dodaje niekodowaną przez DNA serię reszt adeninowych. Sekwencja poli A zabezpiecza powstały mRNA przed zbyt szybką degradacją w cytoplazmie. W plazmidzie pcDNA wykorzystano sygnały poliadenylacji z genu bydłowego czynnika wzrostu – BGH (bovine growth factor) dla mRNA powstającego pod kontrolą promotora CMV i wirusa SV40, który zabezpiecza mRNA kodujący oporność na neomycynę;

4. origin replikacji – sekwencja wiążąca polimerazę DNA odpowiedzialną za powielanie plazmidu. Wektor pcDNA3 jest zaopatrzony w fl ori pochodzącą z SV40 (replikacja w komórkach eukariotycznych syntetyzujących antygen T) i ColE1 umożliwiające replikację wektora w *E. coli*;

5. markery selekcyjne – geny kodujące białka oporności antybiotykowej (w tym przypadku na neomycynę i ampicylinę), pozwalające na wzrost na podłożach selekcyjnych wyłącznie komórkom posiadającym plazmid.

Konstrukcja plazmidu pcDNA3 i innych podobnych wektorów umożliwia stosunkowo proste i wygodne przeprowadzanie manipulacji genetycznych i klonowań, a ponadto zapewnia optymalną ekspresję genu *in vivo*. W ostatnich latach są prowadzone intensywne prace nad wektorami, które mogłyby być zaakceptowane do zastosowania u ludzi i zwierząt. Jakkolwiek nie udowodniono, że dotychczas stosowane plazmidy mają działanie mutagenne, nie można jednak go wykluczyć, ze względu na obecność w wektorach licznych sekwencji wirusowych i bakteryjnych (9).

### Mechanizmy prowadzące do powstania odpowiedzi immunologicznej

Procesy molekularne i komórkowe umożliwiające uzyskanie odpowiedzi immunologicznej po inokulacji czystego kwasu nukleinowego nie zostały jeszcze do końca wyjaśnione. Z dotychczasowych prac wynika, że najsilniejsza odpowiedź organizmu występuje po domięśniowym lub śródskórnym podaniu szczepionki (1).

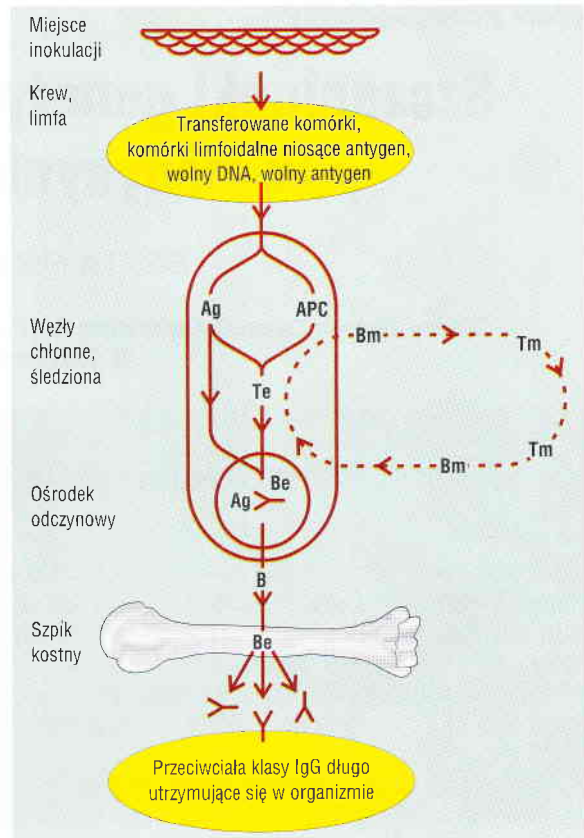
Istnieje kilka możliwych mechanizmów, za pomocą których antygen może być przeniesiony do tkanki limfoidalnej i zaprezentowany limfocytom (11):

– Ekspresja antygeny może zachodzić w komórkach mięśni szkieletowych lub w keratynocytach skóry, które prezentują antygen układowi immunologicznemu.

– Antygen może być uwalniany z transfekowanych komórek, a następnie rozpoznawany przez komórki immunokompetentne.

– Komórki immunokompetentne mogą ulegać bezpośredniej transfekcji w miejscu administracji szczepionki lub przez DNA, które zostało przeniesione przez krew lub limfę do miejsc odległych od rejonu iniekcji.

Hipotetyczny mechanizm powstawania odpowiedzi immunologicznej przedstawia rycina 2. Antygen przeniesiony do węzłów chłonnych i śledziony, jest prezentowany w tkance limfoidalnej limfocytom B i T. Tu następuje ich różnicowanie na komórki efektorowe (Be i



Ryc. 2. Hipotetyczny schemat powstawania odpowiedzi immunologicznej po inokulacji szczepionki genetycznej

Objaśnienia: Ag – antygen, APC – komórki prezentujące antygen, Te – efektorowe limfocyty T, Be – efektorowe limfocyty B, Tm – limfocyty pamięci immunologicznej typu T, Bm – limfocyty pamięci immunologicznej typu B.

Te) oraz komórki pamięci immunologicznej (Bm i Tm). Tworzą się ośrodki odczynowe, w których kompleksy antygen–przeciwciało zdeponowane są na powierzchni komórek dendrytycznych. Różnicujące się w ośrodkach odczynowych limfocyty B migrują do szpiku kostnego i rozpoczynają syntezę przeciwciał klasy IgG długo utrzymujących się w organizmie. Powstające jednocześnie w ośrodkach odczynowych limfocyty pamięci Bm i Tm krążąc we krwi obwodowej, wchodzą w kontakt z Be i podtrzymują produkcję przeciwciał IgG oraz odpowiedź limfocytów cytotolitycznych CTL (cytotoxic T lymphocytes) (11).

W niektórych przypadkach (zwłaszcza gdy wprowadzany gen koduje antygen związany z powierzchnią komórek), sposób podania szczepionki wydaje się wpływać na wzmocnienie określonej odpowiedzi limfocytów pomocniczych Th. Domięśniowa iniekcja DNA w roztworze soli fizjologicznej prowadzi do aktywacji limfocytów Th1, które poprzez produkcję limfokin (zwłaszcza INF1 $\gamma$  i IL-2) aktywują makrofagi i przeciwciała zależne od dopełniacza oraz proces opsonizacji. Śródskórne podanie tej samej szczepionki za pomocą techniki gene-gun wzmocnia odpowiedź limfocytów Th2 (produkcja interleukin 4-6, 10) i aktywuje eozynofile oraz przeciwciała niezależne od dopełniacza (3, 10, 11). Tak więc wpływ sposobu administracji szczepionki genetycz-

nej na rodzaj reakcji limfocytów Th ma niebagatelne znaczenie w zwalczaniu infekcji i modulacji odpowiedzi immunologicznej (np. w chorobach alergicznych i autoimmunologicznych). Należy jednak wyraźnie zaznaczyć, że wiedza dotycząca mechanizmów inicjacji i rozwoju odpowiedzi immunologicznej po zastosowaniu szczepionek genetycznych jest jeszcze bardzo ograniczona i wymaga wielu dodatkowych badań.

### **Czynniki wpływające na skuteczność immunizacji genetycznej**

Badania przeprowadzone na myszach przez Michaela i wsp. (1) wykazały, że na poziom odpowiedzi immunologicznej, a zarazem na skuteczność szczepionek genetycznych ma wpływ wiele czynników, z których największe znaczenie mają:

1. rodzaj użytego antygeny (białko sekrecyjne, wewnątrzkomórkowe itp.), poziom jego ekspresji oraz ewentualna toksyczność dla komórek;
2. gatunek szczepionego zwierzęcia, jego wiek i genotyp;
3. sposób i miejsce administracji szczepionki (iniekcja domięśniowa, gene gun, liposomy);
4. ilość DNA użyta do immunizacji.

Mimo, iż badania dotyczące szczepionek genetycznych są przeprowadzane na różnych modelach zwierzęcych, większość publikowanych prac wykonano na myszach. Prace nad korelacją skuteczności szczepień genetycznych i wieku zwierząt wykazały, że przynajmniej w przypadku niektórych antygenów, poziom indukowanych przez nie przeciwciał maleje proporcjonalnie do wieku myszy użytych do doświadczeń, co może być spowodowane zmianami poziomu ekspresji genów szczepionkowych, związanymi z procesem starzenia się.

Kluczowe znaczenie w stymulacji odpowiedzi immunologicznej organizmu ma rodzaj użytego antygeny. W przypadku antygenów sekrecyjnych, usuwanych z obszaru komórki (np. białka kapsydowe lub otoczkowe wirusów), wysoki poziom ich ekspresji zwiększa ilość produkowanych przeciwciał. Zastosowanie silnego promotora np. wczesnego promotora wirusa cytomegalii (CMV) zapewnia maksymalną odpowiedź immunologiczną. Natomiast w przypadku zastosowania w szczepionce genów kodujących np. toksyny lub białka patogenów wewnątrzkomórkowych, ich silna ekspresja powoduje uszkodzenie transfekowanych komórek lub drastyczne obniżenie poziomu ekspresji białek (17). Dlatego też, aby zaplanować użycie odpowiedniego wektora ekspresyjnego lub odpowiednią modyfikację genu kodującego antygen (np. użycie jedynie fragmentu genu), niezbędna jest znajomość biologii antygeny przeznaczony do zastosowania w szczepionce genetycznej.

Miejsce i sposób wprowadzenia szczepionki do organizmu ma zasadniczy wpływ na rodzaj i skuteczność reakcji immunologicznej. Z dotychczasowych badań wynika, że najbardziej skuteczne jest domięśniowe podanie oczyszczonego plazmidu w roztworze soli fizjologicznej lub śródskórne wprowadzenie szczepionki za pomocą techniki gene-gun (koloidalne cząsteczki złota opłaszczone DNA, rozpędzane są w specjalnym akceleratorze i kierowane na transfekowaną tkankę) (10). Wy-

krywalny poziom przeciwciał występuje również po iniekcji dożylniej, dotchawiczej, podskórnej, dostawowej oraz po wprowadzeniu szczepionki do komory oka (1).

Ostatnio pojawiły się doniesienia o skutecznej immunizacji myszy za pomocą iniekcji dootrzewnowej lub po podaniu doustnym DNA zamkniętego w mikrokapsułkach oznaczonych PLG (poly DL-lactide-co-glycolyde). Tak przygotowana szczepionka nie ulega degradacji i indukuje oprócz ogólnej reakcji immunologicznej również syntezę przeciwciał IgA na błonach śluzowych, które nie są wytwarzane przy śródskórnym i domięśniowym podaniu szczepionek genetycznych (5). Podobną reakcję immunologiczną zaobserwowano po donosowym podaniu plazmidowego DNA zamkniętego w liposomach zbudowanych z kationowych lipidów (6). Jest to bardzo obiecujący sposób ochrony powierzchni błon śluzowych przed zakażeniem.

### **Przykłady konstrukcji szczepionek genetycznych w medycynie weterynaryjnej**

Retrowirus BLV jest czynnikiem etiologicznym białaczki bydła charakteryzującej się przewlekłą limfocytotą oraz proliferacją zmienionych limfocytów B. BLV wywołuje również leukemię u eksperymentalnie zakażanych owiec. Ponieważ kliniczne objawy choroby występują u owiec znacznie szybciej niż u bydła, ocenę właściwości immunogennych szczepionki genetycznej przeciwko zakażeniom BLV wykonano na tym modelu zwierzęcym. Do konstrukcji szczepionki użyto genu otoczki (env) wirusa. Doświadczenie przeprowadzono na dwóch owcach. Po trzeciej, domięśniowej iniekcji plazmidowego DNA, zwierzęta zakażono dzikim szczepem BLV. Szczepionka wykazała właściwości ochronne u owiec przez 4 miesiące po zakażeniu doświadczalnym (7).

Innym przykładem konstrukcji szczepionki genetycznej w medycynie weterynaryjnej jest szczepionka DNA przeciwko chorobie Aujeszkiego u świń. Do sporządzenia jej użyto genów dla immunogennych glikoprotein otoczki gC i gD alfa herpeswirusa. Szczepienie świń plazmidowym DNA zawierającym gen dla gC zapewniało pełną ochronę zwierząt przed letalnym zakażeniem szczepem NIA-3. Szczepionka sporządzona z genu gD nie wywołała żadnej odpowiedzi immunologicznej. Swoiste przeciwciała były wykrywane w surowicy szczepionych zwierząt do dziewiątego miesiąca po immunizacji plazmidem zawierającym gen gC. Wykazano również odporność komórkową w próbie proliferacji z komórkami mononuklearnymi krwi obwodowej (4).

Szczepionka DNA przeciwko pryszczycy (FMD – foot and mouth disease) została skonstruowana w oparciu o cDNA kompletnego genomu dzikiego wirusa typu A12. Prototypowy plazmid pWRM (pochodna pcDNA3) z niską częstością indukował syntezę cząsteczek wirusowych *in vitro* w hodowli tkankowej komórek BHK. Plazmid szczepionkowy pWRMHX powstał przez usunięcie sekwencji kodującej miejsce wiązania komórek (CBS – cell binding site) znajdujące się na kapsydowym białku VP1 i dodatnie do 3' końca sekwencji wirusowej cDNA kodującej rybozym HDV (hepatitis delta virus). Immunizacja myszy plazmidem pWRMHX wykazała,

że powstające cząsteczki wirusa, pozbawione CBS nie są w stanie się namnażać. Również świnię szczepioną tym plazmidem nie wykazywały żadnych objawów klinicznych choroby, zaś w ich surowicach stwierdzono przeciwciała neutralizujące wirus pryszczycy. Skuteczność szczepionki oceniono na 20% (15).

Do sporządzenia szczepionki przeciwko zakażeniom wirusem FIV u kotów (feline immunodeficiency virus) zastosowano geny gp120 i p10 kodujące jego białka strukturalne. Domięśniowa iniekcja plazmidu kodującego białko gp120 indukowała słabą odpowiedź humoralną. Dwukrotna immunizacja kotów wywołała różne reakcje zwierząt po próbie biologicznej. U części kotów, po 2 tygodniach od challenge zaobserwowano objawy zakażenia wirusem FIV, w drugiej zaś grupie nie doszło do infekcji. Koty szczepione jednocześnie gp120 i p10 rozwinęły pełną odpowiedź humoralną przeciwko białkom wirusa dopiero po zakażeniu doświadczalnym. Autorzy pracy przypuszczają, że uzyskane wyniki mogą być spowodowane niskim poziomem ekspresji wprowadzonych genów, a także błędami w konstrukcji samej szczepionki (2).

Skuteczna ochrona przed zakażeniami wywołanymi przez bakterie będące wewnątrzkomórkowymi patogenami zależy przede wszystkim od odporności komórkowej. Dlatego też do konstrukcji szczepionki genetycznej przeciwko brucelozie wykorzystano gen kodujący rybosomalne białko L7/L12 *B. abortus*, które jak wykazały wcześniejsze badania, jest silnym stymulatorem limfocytów bydłych. Jako wektory zastosowano dwa eukariotyczne plazmidy ekspresyjne – pcDNA3 (wczesny promotor ludzkiego CV) i p6 (bydłęcy promotor MHC I – BL3-6). Szczepionkę testowano na 6 tygodniowych myszach BALB/cByJ. Zwierzęta immunizowano odpowiednio: pcDNA3-L7/L12, p6-L7/L12 i atenuowanym szczepem *B. abortus* S19, a następnie zakażono zjadliwym szczepem *B. abortus* – S2308. Indukcję limfocytów T badano w splenocytach izolowanych po 10, 20 i 30 dniach od zakażenia. Myszy immunizowane szczepionką genetyczną pcDNA3-L7/L12 uzyskały stopień ochrony porównywalny do poziomu występującego u zwierząt szczepionych komercyjną szczepionką sporządzoną ze szczepu S19. Po inokulacji plazmidu p6-L7/L12 stwierdzono u myszy proliferację limfocytów T, ale nie zapewniła ona znaczącej ochrony zwierząt przed zakażeniem przed *B. abortus* S2308 (8).

BVDV (bovine viral diarrhoea virus) jest jednoniciowym wirusem RNA zawierającym jedną dużą otwartą ramkę odczytu (ORF), kodującą białko o przybliżonej masie 450 kD. W wyniku ko- i post- translacyjnej obróbki powstaje 6 białek niestrukturalnych (Npro, NS23, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B), jedno białko kapsydowe (p14) i trzy glikoproteiny otoczki (gp48, 25, 53). Do konstrukcji szczepionki genetycznej wykorzystano zamplifikowany region genomu wirusa kodujący główną glikoproteinę cytopatogennego szczepu BVDV (NADL c) – gp53. Plazmid pcDNA/gp3 podawano myszom domięśniowo i śródskórnym. W obu przypadkach stwierdzono u nich syntezę przeciwciał neutralizujących wirus, które obecne były jeszcze sześć miesięcy po immu-

nizacji. Poziom przeciwciał był wyższy u myszy szczepionych domięśniowo (12).

## Podsumowanie

Celem szczepienia jest efektywna prezentacja antygeny chroniąca organizm przed zakażeniem wybranym patogenem. Obecnie stosowane szczepionki komercyjne zawierają w większości drobnoustroje inaktywowane lub atenuowane. Tego typu szczepionki są często nieefektywne, potencjalnie niebezpieczne i drogie. W przypadku szczepów atenuowanych istnieje potencjalna możliwość ich rewersji do formy zjadliwej, stwierdzane jest również siewstwo drobnoustrojów, immunosupresja lub interferencja ze zjadliwymi patogenami. Szczepionki zabite są bardziej stabilne i bezpieczne, ale wymagają dwukrotnego szczepienia, muszą zawierać wysoką koncentrację antygeny oraz nie są zdolne do indukcji cytotoksycznej odpowiedzi komórkowej. Ponadto proces inaktywacji może powodować utratę niektórych epitopów. Produkcja szczepionek podjednostkowych i rekombinowanych jest natomiast kosztowna, co znacznie ogranicza ich zastosowanie w praktyce (16). Alternatywą dla obecnych sposobów immunizacji mogą w niedługim czasie stać się szczepionki genetyczne. Są one dużo prostsze w produkcji, od obecnie stosowanych komercyjnych immunopreparatów. DNA jest bardzo stabilne i odporne na temperaturę, dlatego przechowywanie, transport i dystrybucja szczepionek genetycznych wydaje się mniej skomplikowana. Z punktu widzenia immunofizjologii molekularnej możliwe są niemal nieograniczone modyfikacje sekwencji kodującej białko antygeny lub dodawanie heterologicznych epitopów przez manipulację na plazmidowym DNA, które pozwalają na coraz lepsze zrozumienie relacji między strukturą i funkcją antygeny, a reakcją systemu immunologicznego.

## Piśmiennictwo

1. Barry M. A., Johnston S. A.: Vaccine 15, 788, 1997.
2. Cuisiner A. M., Mallet V., Mayer A., Caldora C., Aubert A.: Vaccine 15, 1085, 1997.
3. Feltquate D. M., Heany S., Webster R. G., Robinson H. L.: J. Immunol. 158, 2278, 1997.
4. Gerds V., Jöns A., Makoschey B., Mettenleiter T. C.: Proc. 4th Internat. Congress Veterinary Virology, Edinburgh, 1997, s. 79.
5. Jones D. H., Corris S., McDonald S., Clegg J. C. S., Farrar G. H.: Vaccine 15, 814, 1997.
6. Klavinskis L. S., Gao L., Barnfield C., Lehner T., Parker S.: Vaccine 15, 818, 1997.
7. Kerkhofs P., Portetelle D., Knapen K., Mammeick M., Burny A., Kettmann R., Willems L.: Proc. 4th Internat. Congress Veterinary Virology, Edinburgh, 1997, s. 83.
8. Kurar E., Splitter G. A.: Vaccine 15, 1851, 1997.
9. Norman J. A., Hobart P., Manthorpe M., Felgner P., Wheeler C.: Vaccine 15, 801, 1997.
10. Pertmer T. M., Eisenbraun M. D., McCabe D., Prayaga S. K., Fuller D. H., Haynes J. R.: Vaccine 13, 1427, 1995.
11. Robinson H. L.: Vaccine 15, 785, 1997.
12. Talbot B., Mbikay M., Elazhary Y.: FEMS Microbiol. Letters 146, 229, 1997.
13. Tang D. L., DeVit M., Johnston S. A.: Nature 356, 152, 1992.
14. Waalen J.: Annals Inter. Med. 15 Jan., 1997 (Internet [www.acponline.org/journals/annals/15jan97/currdna.htm](http://www.acponline.org/journals/annals/15jan97/currdna.htm)).
15. Ward G., Rieder E., Mason P. W.: J. Virology 71, 7442, 1997.
16. Whalen R. G.: Intervirology 39, 120, 1996.
17. Xiang Z. Q., Spitalnik S. L., Cheng J., Erikson J., Wojczyk B., Ertl H. C. J.: Virology 209, 569, 1995.

Adres autora: doc. dr hab. Beata Mizak, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy