

Dorota Żakowska, Janusz Kocik, Michał Bartoszcze

WYBRANE KIERUNKI BADAŃ NAD SZCZEPIONKAMI PRZECIWKO WĄGLIKOWI

SELECTED RESEARCH PROBLEMS OF ANTHRAX VACCINE DEVELOPMENT

Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Warszawa

STRESZCZENIE

Zagrożenie ze strony ataków bioterrorystycznych z użyciem *Bacillus anthracis* zwróciło zainteresowanie naukowców problemami ochrony przed wąglikiem, a zwłaszcza szczepionkami. Obecne są na rynku zachodnim dwie licencjonowane szczepionki przeciwko wąglikowi tj. amerykańska i angielska. Obie, oparte na antygenie PA poddawane są krytyce. Wymagają one wielokrotnego podania drogą iniekcji, z koniecznością corocznego doszczepiania, dają reakcje uboczne, odporność po szczepieniach nie jest długa, nie zabezpieczają przed różnymi szczepami *B. anthracis*. Badania nad wprowadzeniem nowej generacji szczepionek zmierzają w kierunku otrzymania szczepionek rekombinowanych, podjednostkowych, zmutowanych i skoniugowanych. Dzięki proteomice znajduje się nowe immunogeny, które mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w ochronie przed wąglikiem. Poszukiwane są też drogi łatwego i skuteczniejszego sposobu podawania szczepionek.

Słowa kluczowe: *B. anthracis*, wąglik, szczepionki

WSTĘP

Wąglik jest zakaźną, wysoce niebezpieczną i ostrą chorobą odzwierzęcą przebiegającą pod postacią jelitową, płucną lub skórą. Rezerwuarem zarazka jak i głównym źródłem zakażenia są zwierzęta parzystokopytne, głównie bydło i owce. Chorobę wywołuje *Bacillus anthracis*, który w formie przetrwalników może przebywać w środowisku kilkadziesiąt lat. Człowiek ulega zakażeniu: po zjedzeniu zakażonych produktów zwierzęcych, w wyniku zadrapań i skaleczeń skóry oraz w wyniku inhalacji przetrwalników drogą aerozolową. Wąglik jako potencjalne zagrożenie zwrócił uwagę świata po udanych bioterrorystycznych atakach pocztowych w USA, w wyniku których 32 000 osób otrzymało antybiotyki, 20 zachorowało, a 5 zmarło. Ataki te spowodowały panikę, dezorganizację i zmiany

ABSTRACT

The threat of bioterrorism with *B. anthracis* against civilian population is one of major concern. After successful bioterroristic attack in 2001 in US renewed research interest has prompted in the development of new and more effective vaccine against anthrax. There are two licensed vaccines against anthrax – AVA–Bio-Thrax US and UK – sterile culture filtrate prepared by alum precipitation. Both vaccines are based on PA antigen. There are several concerns regarding PA based vaccines. They require six injections and yearly booster, high rates of local reaction after vaccination is observed, the immunity is not long lasting, vaccination do not protect animals against different strains of *B. anthracis*. New strategies in the development of anthrax vaccines have been presented (recombinant PA, subunits vaccine, mutants, conjugated). Using proteomic approaches new antigens have been also identified as candidates for future vaccines. More effective and easy to perform methods of vaccination have been reviewed.

Key words: *B. anthracis*, anthrax, vaccines

zachowań społecznych (1, 2, 3). Jedną z najskuteczniejszych metod ochrony ludzi przed wąglikiem są szczepienia ochronne.

MECHANIZM ZAKAŻENIA

Laseczka węglikowa wytwarza toksynę letalną i toksynę obrzęku. Toksyna składa się z antygeny ochronnego (PA - protective antigen) oraz odpowiednio czynnika letalnego (LF – lethal factor) lub czynnika obrzęku (EF – edema factor).

Po wnikięciu przetrwalników *B. anthracis* do organizmu następuje proces ich kiełkowania, w wyniku którego powstają formy wegetatywne, zdolne do produkcji toksyn (PA-protective antigen, LF-lethal factor i EF-edema factor).

Antygen PA wiąże się do receptora komórkowego (ATR - *anthrax toxin receptor*), po czym w wyniku trawienia przez proteazy komórkowe dochodzi do uwolnienia się PA20 kDa, który nie odgrywa prawdopodobnie większej roli w zakażeniu oraz C-końcowego fragmentu PA63 kDa, który podlega polimeryzacji przyjmując postać heptameru. Do tego składnika wiążą się LF lub EF, przemieszczając się następnie do wnętrza komórki na drodze endocytozy. Dzięki niskiemu pH dochodzi do wbudowania heptameru w błonę endosomalną, skąd LF i EF uwalniają się przechodząc do cytozolu komórki, co następuje dzięki pierwszemu typowi białek membranowych i czynnikiowi VWA (*von Willebrand factor A*).

LF jest proteazą cynkową inaktywującą elementy kaskady kinaz białkowych, a EF jest cyklazą adenylową powodującą wzrost stężenia cAMP (cykliczny adenyzyonomonofosforan) w monocytach, prowadząc do ich obumierania i w konsekwencji do osłabienia zdolności obronnych organizmu (4). Białko PA zbudowane jest z czterech domen: D-1 zawiera dwa jony Ca i miejsce wrażliwe na proteazy, D-2 ma charakter pętli, która wchodzi do komórki tworząc pory, D-3 odpowiada za tworzenie heptameru PA63, a domena 4 przyłącza się do receptora komórkowego (5). Powyższe mechanizmy zostały wykorzystane do opracowania strategii w opracowaniu nowych szczepionek przeciwko wągliкови.

AKTUALNIE STOSOWANE SZCZEPIONKI

Obecnie dopuszczone do stosowania szczepionki oparte są na antygenie PA (*protective antigen*). Szczepionka stosowana w USA o nazwie AVA-BioThrax jest pierwszą licencjonowaną szczepionką produkowaną w oparciu o szczep V770-NP1-R *B. anthracis*. Stanowi ona bezkomórkowy przesącz hodowli wspomnianej bakterii adsorbowany na wodorotlenku glinu. Do produkcji szczepionki w Wielkiej Brytanii stosuje się szczep 34F2 *B. anthracis*, a szczepionka jest otrzymywana przez wytrącenie supernatantu hodowli bakteryjnej wodorotlenkiem glinu i zawiera niewielkie ilości LF oraz innych białek (6,7). Szczepionki tego typu dają odporność m.in. na zakażenie aerozolowe, co jest niezwykle ważne z punktu widzenia zagrożeń bioterrorystycznych. W badaniach na małpach wykazano, że podanie 2 dawek szczepionki w odstępie 2 tygodni chroniło w pełni te zwierzęta przed zakażeniem aerozolowym przetrwalnikami *Bacillus anthracis* w 8 i 38 tygodniu, a w 88% - po 100 tygodniach po szczepieniu. W latach 1998 - 2006 przy użyciu szczepionki AVA-BioThrax zaszczepiono 1,2 mln żołnierzy amerykańskich. W badaniach pobranych od nich 246 surowic wykazano, że po 4 dawkach szczepionki serokonwersja kształtowała się na poziomie 100% (7,8,9). Szczepionki zawierające PA dają jednak

niepożądane odczyny poszczepienne (NOP) obserwowane u 30% mężczyzn i 60% kobiet, przy czym ciężkie odczyny nie przekraczają 1%. Szczepionka brytyjska daje 11% NOP, bez przypadków ciężkich (10).

Do innych wad tego typu szczepionek należy zaliczyć brak pełnej ochrony świnek morskich oraz chomików przed aerozolowym zakażeniem wysoce zjadliwym szczepem *Bacillus anthracis*, nawet po pełnej immunizacji (11).

REKOMBINOWANE BIAŁKO PA

Szczepionki zawierające PA są obecnie poddawane krytyce z uwagi na: niemożność wystandaryzowania preparatu (partie szczepionki mogą się różnić składem), istnienie konieczności podawania kilku dawek z corocznym doszczepianiem, występujące często NOP, krótko utrzymująca się odporność, oraz brak odporności wobec niektórych szczepów *B. anthracis*.

Biorąc pod uwagę powyższe mankamenty duży wysiłek skierowano na wyprodukowanie i sprawdzenie skuteczności ochronnej rekombinowanego białka PA (rPA). Otrzymane nowoczesnymi technologiami białko można łatwo oczyścić, skoncentrować i użyć w celach profilaktycznych. Do otrzymywania rPA w skali produkcyjnej stosuje się w USA (firma Vaxgen) niezarodnikujący szczep *Sterne* oraz ekspresyjny system MCPBES (*multi-copy plasmid base expression system*), a w Wielkiej Brytanii użyto w tym celu *E. coli*, stosując system NCOGE (*nucleotide-codon-optimized gene expression*) o wydajności 1g rPA/litr. Produkt ten gromadzi się w chwili obecnej w USA, jako zapas strategiczny na wypadek wąglikowych incydentów terrorystycznych i wystąpienia sytuacji kryzysowej (10).

Wstępne badania wykazały, że przy użyciu rekombinowanego PA można stosować mniejsze dawki uodporniające od dawek przewidzianych dla szczepionki AVA-BioThrax. Szczepionka rekombinowana wymaga jednak podania drogą iniekcji, co jest dużym mankamentem, zwłaszcza przy konieczności wykonania szczepień masowych (dla usprawnienia szczepień specjalnie szkoli się w tym celu personel). Szczepionki rekombinowane wymagają przechowywania w warunkach 4°C, co wpływa na dodatkowe koszty, związane z ich składowaniem (10). Opracowano wiele układów dających ekspresję białka PA, wykorzystując w tym celu m.in.: *B. anthracis*, *B. subtilis*, *Salmonella Typhimurium*, *E. coli*, *Vaccinia* (11). Przeprowadzono np. badania nad klonowaniem genu *pag* kodującego białko PA, do szczepu *Salmonella enterica* serotypu Typhimurium w kasecie Hly-export *Escherichia coli* umożliwiającej eksport białka. Po podaniu doustnym myszom rekombinanta, obserwowano zróżnicowaną reakcję humoralną w poszczególnych grupach, od

reakcji zerowej do bardzo wysokiej. Stwierdzono, że wyniki były niezależne od metody namnażania bakterii i drogi ich podawania (12). Należy jednak zaznaczyć, że nawet oczyszczone, wystandaryzowane białko rPA nie zapewnia długotrwałej odporności u osób szczepionych, gdyż indukuje głównie odporność humoralną.

„ENDOSOMAL TRAPPING”

U osób eksponowanych na przetrwalniki *B. anthracis* stosuje się antybiotyki, a dla skrócenia czasu ich podawania z 60 do 30 dni zaleca się rozpoczęcie szczepień przeciwwąglikowych. Ostatnio zwraca się uwagę, że podanie w trakcie infekcji antybiotyku wraz ze szczepionką zawierającą PA może być niebezpieczne z uwagi na skumulowane działanie toksyn (11). Sugeruje się, że w takiej sytuacji zamiast PA, należałoby zastosować DNI (*dominant negative inhibitor*), mutant PA, który w badaniach na zwierzętach dawał natychmiastowy efekt terapeutyczny, a zastosowany jako szczepionka okazał się bardziej immunogenny aniżeli PA. DNI jest translokacyjnym mutantem PA, posiadającym mutacje D425K i K397D, interferującym w procesach intoksykacji. Dwie mutacje w DNI/PA hamują zmiany konformacyjne, zapobiegając włączaniu się heptameru w endosomalną membranę, co w konsekwencji prowadzi do hamowania translokacji LF lub EF do cytozolu, zapobiegając toksycznemu obumieraniu komórek. DNI może być bezpiecznie stosowany również z antybiotykiem, a w przypadku szczepów antybiotyko-opornych może być podawany w celach leczniczych. Powyższy przykład wskazuje na nowe możliwości w rozwoju strategii hamowania rozwoju zakażenia *B. anthracis* (11).

SZCZEPIONKI PODJEDNOSTKOWE

W badaniach surowic pochodzących od zwierząt po przebytej infekcji *B. anthracis* wykazano obecność nie tylko przeciwciał anty PA, ale także i innych, co mogło wskazywać, że poza PA w odpowiedzi immunologicznej organizmu biorą także udział i inne czynniki, które mogą działać synergistycznie.

Badano m.in. wpływ domeny IV (PAD4) oraz I domeny czynnika LF połączonych łącznie z lichenazą (LicKM) na reakcję immunologiczną organizmu. W badaniach przeprowadzonych na myszach uzyskano bardzo obiecujące wyniki. Te dwie domeny łącznie z lichenazą (enzymem termostabilnym z *Clostridium thermocellum*) dawały długo utrzymującą się odpowiedź immunologiczną, przy czym przeciwciała hamowały proces adsorpcji PA i wnikanie LF do komórki (13).

Nietoksyczny mutant czynnika letalnego (mLF) i funkcjonalny antygen PA63 badano na myszach A/J, które szczepiono donosowo przeciwko wąglikowi. Przy szczepieniu zwierząt trzema dawkami po 30 µg mLF lub po 60 µg PA63 uzyskano miana 40 i 60 przeciwciał neutralizujących toksynę letalną laseczki wąglika w surowicy, ale tylko 30% i 60% zaszczepionych zwierząt w dwóch grupach przeżyło zakażenie *B. anthracis*. Po połączeniu obydwu składników przy szczepieniu zwierząt wykazano u nich wysokie miana przeciwciał i całkowitą ochronę zwierząt przed zakażeniem, co przemawia za synergistycznym działaniem mLF i PA63 w indukcji śluzówkowej odpowiedzi immunologicznej (14).

Dobre efekty uzyskano także z użyciem C3d (składnik dopełniacza) skoniugowanego z antygenem PA. Koniugat dawał szybką odpowiedź immunologiczną, dziesięciokrotnie skuteczniejszą w porównaniu do tradycyjnej szczepionki PA z wodorotlenkiem glinu, a co więcej, stymulował on u szczepionych zwierząt mechanizmy odporności komórkowej (15).

Mimo, że surowica anty PA hamuje działanie toksyny wąglikowej, stwierdzono eksperymentalnie, że podanie samego LF, jako antygeny, chroniło także myszy przed zakażeniem *B. anthracis*. Połączenie PA i LF dawało jednak najlepsze wyniki uodparniające, co było związane prawdopodobnie ze stymulacją nie tylko odpowiedzi humoralnej, ale i komórkowej organizmu.

W badaniach na królikach wykazano, że rekombinowany PA (rPA) i triwalentna szczepionka (TV), w której skład wchodzi rPA, inaktywowane mutanty LF (mLF-Y728A; E735A) i EF (mEF-K346R), podane podskórnie dawały silną odpowiedź immunologiczną, wyrażoną wysokim mianem przeciwciał dla PA, LF i EF. W tydzień po immunizacji szczepionka chroniła 100% królików zakażonych zjadliwym szczepem *B. anthracis*, co jest niezwykle obiecujące (16).

SZCZEPIONKI DNA

Szczepionki DNA zawierają materiał genetyczny kodujący cząsteczki białkowe antygenów pod kontrolą odpowiednio dobranych sekwencji regulatorowych, zapewniających efektywną ekspresję białek w komórkach uodpornionego organizmu. Pierwsze prace nad szczepionką DNA przeciwko wąglikowi wykonali Gu i wsp. (7), którzy stwierdzili, że trzy inokulacje plazmidowym DNA kodującym fragment PA (PA 173-735), zawierającym sekwencję sekrecyjną, pozwalającą na wydzielanie białka PA63 przez transformowane komórki, z trzytygodniowymi przerwami, chroniły myszy przed letalną dawką toksyny. W badaniach tych obserwowano silną odpowiedź immunologiczną wyrażającą się w produkcji przeciwciał IgG2, IgG1

oraz IFN- γ (interferon) i IL-4 (interleukina). W cytowanych badaniach wykazano zwiększoną 3,6-krotnie odpowiedź serologiczną u małp z rodzaju *Rhesus* po dwumiesięcznej inokulacji plazmidowym DNA, dającym ekspresję biologicznie nieaktywnego PA lub LF w połączeniu z adiuwantem kationowo-tłuszczowym (*cationic lipids VaxfectinTM*). Ekspresja w szczepionce DNA zarówno LF jak i PA wpływała korzystnie na reakcję immunologiczną organizmu (7).

W szczepionkach plazmidowych wykorzystano także, poza podjednostkami toksyny, białka powierzchniowe SLH (S-layer homology): EA1 (BA0887) i SAP (BA0885) wykazując, że antygeny EA1 i SAP, posiadające specyficzne wzory (PAMPs) - (*pathogen-associated molecular patterns*), uaktywniające sygnały TLR (*toll-like receptors*), wywołują silniejszą odpowiedź immunologiczną niż antygeny, u których brak jest wzorów PAMPs. Plazmidy z zakodowaną informacją dla ekspresji białek powierzchniowych *B. anthracis* stymulowały odpowiedź immunologiczną, zarówno humoralną, jak i komórkową. Szczepione myszy konstruktami dającymi ekspresję białka EA1 wpływały pozytywnie na odpowiedź specyficznych limfocytów Th-1, produkując IFN- γ (interferon) i CTL (*cytotoxic T lymphocytes*) (17).

Opisano także szczepionki wprowadzane przez bezpośrednie wstrzeliwanie przez skórę opłaszczonych złotem cząsteczek szczepionki DNA dla łatwiejszego dotarcia do znajdujących się pod skórą właściwą komórek dendrytycznych, uzyskując przy tym dobre efekty (10).

Wykorzystano nową metodę wprowadzania drogą domięśniową plazmidu kodującego antygen PA toksyny węglikowej z użyciem elektropolacji (EP – *electroporation*). Metoda ta jest dużo skuteczniejsza od innych metod, ponieważ szybciej indukowane są przeciwciała IgG anty-PA i anty-LF, co ma miejsce już w okresie dwóch tygodni po pojedynczym szczepieniu. Wyniki wskazują, że technologia EP może być platformą do wprowadzania do organizmu szczepionek DNA przeciwko węglikowi, a także przeciwko innym czynnikom biologicznym.

U wszystkich przetestowanych gatunków zwierząt (myszy, króliki) szczepienie z zastosowaniem EP wpływało na 100% indukcję przeciwciał neutralizujących toksynę w 2–3 tygodni po pojedynczej immunizacji. Metoda ta daje duże nadzieje na uzyskanie szybkiej odpowiedzi poszczepiennej organizmu, co przy zagrożeniu atakami bioterrorystycznymi ma pierwszorzędne znaczenie. Skuteczność pojedynczej dawki szczepionki wprowadzonej metodą EP zachęciła do włączenia dla celów uodpornienia więcej niż jednego plazmidu, prowadząc do powstania poliwalentnej szczepionki genetycznej (18). Stosowanie szczepionek DNA jest obiecującą metodą uodporniania przeciwko czynnikom

biologicznym. Szczepionki te są stosunkowo łatwe w konstruowaniu, produkcji i przechowywaniu, gdyż nie wymagają niskich temperatur składowania. Ocena skuteczności szczepionek genetycznych u ludzi jest przedmiotem intensywnych badań. (10).

SZCZEPIONKI ALTERNATYWNE

Bezpieczniejszą alternatywą od stosowania PA, jako szczepionki przeciwwęglikowej, może być jego niefunkcyjny mutant. W celu ulepszenia szczepionki węglikowej przebadano cztery niefunkcyjne mutanty PA, a wśród nich: Rec⁻ (niezdolny do wiązania receptorów PA), SSSR (oporny w aktywacji przez furynę), Oligo⁻ (niezdolny do formowania oligomerów) i DNI (niezdolny do formowania otworów w endosomalnej transmembranie).

W badaniach na myszach stwierdzono, że po trzech dawkach uodporniających, wszystkie cztery mutanty indukowały przeciwciała neutralizujące toksynę, przy czym najsilniejsze działanie wykazywały DNI i Oligo⁻. W rok po immunizacji myszy DNI, utrzymywał się znacząco wysoki poziom anty-PA IgG i przeciwciał neutralizujących toksynę. Mutanty rekombinanta PA, a zwłaszcza DNI rodują duże nadzieje w aspekcie ich stosowania poekspozycyjnego (19).

SZCZEPIONKI PRZECIWKO ZARODNIKOM, FORMOM WEGETATYWNYM I TOKSYNOM

Idealna szczepionka powinna zawierać antygeny przeciwko formom wegetatywnym i toksynom (10). Wykazano bowiem, że po naturalnym zakażeniu *B. anthracis* wykrywa się u zwierząt przeciwciała dla PA, LF, EF, a także przeciwko antygenom otoczki (67-94%), co więcej, przeciwciała takie utrzymują się bardzo długo w organizmie (11).

Panuje pogląd, że szczepionka przeciwwęglikowa powinna stymulować odporność skierowaną zarówno przeciwko zarodnikom, nie dopuszczając do ich kiełkowania, jak i formom wegetatywnym oraz hamować aktywność toksyn i wpływać drogą opsonizacji na komórki żerne, prowadząc do niszczenia laseczek *B. anthracis*.

Zwraca się także uwagę, o czym wspomniano wcześniej, że poekspozycyjne stosowanie szczepionek opartych na PA wraz z antybiotykami może być niebezpieczne przez kumulowanie się efektu toksycznego. Otoczka chroniąca *B. anthracis* przed fagocytozą jest słabym immunogenem. Jeżeli jednak połączymy ją z nośnikiem białkowym, uzyskamy silną odpowiedź immunologiczną i pobudzenie funkcji żernych makro-

fagów. W związku z tym, że w patogenezie węglika namnażanie się laseczek i produkcja przez nie toksyn odgrywa najważniejszą rolę, skoniugowano chemicznie otoczkę PGA (*poly- γ -D-glutamic acid*) i PA tworząc tzw. DAAV (*dually active anthrax vaccine*). Ta dwoista szczepionka DAAV jest zdolna do indukcji wysokiego poziomu specyficznych przeciwciał, zarówno przeciw otoczce, jak i toksynie, dzięki czemu bakterie zostaną wyeliminowane we wczesnej fazie zakażenia, zapobiegając w ten sposób bakteriemii i toksemii. DAAV łączy w ten sposób działanie ochronne i terapeutyczno-antytoksyczne (11).

PROTEOMIKA W IDENTYFIKACJI IMMUNOGENÓW

Dzięki proteomice wykrywa się nowe białka powstające w wyniku zakażenia *B. anthracis*, wśród których można znaleźć czynniki o silnych właściwościach immunogennych. Zasadniczym celem w dążeniu do unowocześnienia szczepionek przeciwko węglikowi jest wyeliminowanie konieczności wielokrotnego podawania szczepionki oraz stosowania adiuwantów. SCAP (*spore coat - associated protein*) użyto do donosowego uodparniania myszy, u których obserwowano reakcję immunologiczną w trzy tygodnie po szczepieniu. Wyizolowany dzięki proteomice SCAP wprowadzono do ekspresyjnego wektora, który poddano napromieniowaniu. SCAP wykazuje 99,5% podobieństwo do camelysiny (TasA) *B. cereus*, ma właściwości wiązania się do powierzchni komórek i wykazuje aktywność proteolityczną (20). Z uwagi na to, że zarodniki stanowią układ wysoce konserwatywny i nie ulegają tak częstym zmianom, jak to ma miejsce z nabywaniem cech antybiotykooporności, daje to szansę ochrony ludzi w przypadku celowego użycia mutantu *B. anthracis*, posiadającego zdolności do produkowania np. toksyny tężcowej.

Wspomniany wcześniej, inaktywowany UV system ekspresji daje silną odpowiedź immunologiczną, zbędne jest zatem stosowanie adiuwantu, a w wyniku szczepienia dochodzi także do odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego. Powyższa technologia eliminuje konieczność oczyszczania antygeny, co ma miejsce w przypadku pierwszych szczepionek licencjonowanych. Skuteczność donosowej drogi uodparniania pozwala na rozwiązanie wielu problemów logistycznych w przypadku ataków masowych z użyciem zarodników *B. anthracis* (21).

Białka, które potencjalnie mogą być kandydatami na nowe szczepionki, były identyfikowane z użyciem surowicy poliklonalnej pochodzącej od ludzi po przebyciu skórnej postaci węglika. Dzięki proteomice możliwa będzie identyfikacja nowych immunoreaktywnych białek

przetrawialników *Bacillus anthracis* przydatnych dla rozwoju bardziej bezpiecznych, specyficznych i wysoce skutecznych szczepionek przeciw węglikowym. Można będzie także ocenić immunogenne właściwości wielu białek produkowanych w trakcie zakażenia *B. anthracis*, SAP, EA1, GroEL (*heat shock protein*), AhpC (*hydroperoxide reductase*), MntA (BA3189), HtrA (BA3660), endopeptydaza i inne białka, zarówno o znanych, jak i o nieznanym funkcjach. Wykazano obecność 8 immunogenów po immunizacji świń morskich szczepionką DNA, których efektywność była porównywalna z efektywnością szczepionki PA DNA (22).

Wysoce immunogenne białka identyfikowano w surowicy pobranej od pacjentów, którzy zostali całkowicie wyleczeni z węglika. Jednostki antygeny PA o masie cząsteczkowej 83 i 63kDa były po enolazie (BA5364) i transketolazie (jeden z enzymów cyklu pentozofosforanowego), składnikami o wysokiej aktywności immunogennej.

Białka membranowe SAP i EA1 były wydzielane w dużych ilościach zewnątrzkomórkowo, jako białka ściany komórkowej. Oba te białka, jako antygeny powierzchniowe, są potencjalnymi kandydatami na szczepionkę, stanowiąc wraz z enolazą i transketolazą interesujący obiekt do badań nad szczepionkami nowej generacji (23).

EFEKTYWNE DROGI PODANIA SZCZEPIONKI

Po ataku bioterrorystycznym w 2001 r. wyłoniły się nieoczekiwane nowe problemy związane z zabezpieczeniem ludzi przed węglikami.

Kluczowym zadaniem jest stworzenie możliwości przeprowadzenia w krótkim czasie masowych szczepień ludzi przeciwko tej chorobie. Ze względów logistycznych podanie szczepionki drogą iniekcji byłoby niezwykle trudne. W świetle najnowszych badań nie jest to także najskuteczniejsza droga podania szczepionki w aspekcie reakcji immunologicznej organizmu i skuteczności szczepień. Biorąc to pod uwagę badano efektywność szczepień przy różnych drogach podania szczepionki jak np.: drogą doustną, donosową, naskórną.

SZCZEPIENIA DROGĄ DOUSTNĄ. Rozwój doustnych szczepionek skupia się głównie na bakteryjnych wektorach i na jadalnych antygenach, których ekspresja zachodzi w roślinach. Szczep *Salmonella enterica* Typhimurium, ekspresjonujący białko PA, chronił myszy przed ekspozycją na zarodniki *B. anthracis*, jednakże wymagało to kilkakrotnego podawania doustnego szczepionki, przy czym podanie doustne było nieskuteczne.

Rozpatrywano zasadność użycia bakterii kwasu mlekowego jako żywej szczepionki podawanej drogą doustną. Szczepionki takie są bezpieczne, stabilne, niedrogie, łatwe do podania i wywołują odpowiedź zarówno komórkową i humoralną.

W ten sposób można z sukcesem stosować *L. acidophilus*, który posiada białka zdolne do fuzji z krótkim peptydem DC (*dendritic cells*). Bakteria ta pobudza komórki śluzówki przez antygen z DCs, które z kolei indukują produkcję przeciwciał neutralizujących anty – PA oraz inicjuje odpowiedź komórek T przeciwko *B. anthracis* (24).

Skuteczność podawania drogą doustną *Lactobacillus acidophilus* z ekspresją PA-DCpep oceniano u myszy, u których obserwowano silną ochronę przeciwko *Bacillus anthracis*, porównywalną z grupą szczepioną *Lactobacillus acidophilus* ekspresjonującego kontrolny peptyd-PA. Potencjalną szczepionką doustną przeciwwąglikową może być również *Lactobacillus casei* (10). W celu użycia bakterii *Salmonella* dla celów immunizacji skonstruowano warianty serowaru *Salmonella typhi*. Użyto w tym celu szczepu *Salmonella typhi* Ty21, na którym oparta jest licencjonowana szczepionka przeciwko durowi brzuszemu u ludzi. Geny antygeny PA eksportowano w plazmidach do dwóch systemów ekspresjonujących: hemolizyny Hly A *Escherichia coli* i ClyA *Salmonelli typhi*. Badania na myszach wykazały wzmocnione działanie immunogenne obydwu konstruktów.

Wskazano na przydatność doustnego podawania szczepionki opartej na komórkach *Salmonella* zdolnych do ekspresji antygeny ochronnego *Bacillus anthracis*, dającej ochronę myszy przeciwko letalnej dawce *B. anthracis*. Wykorzystanie plazmidów ekspresjonujących PA *Salmonelli typhi* Ty21 jest dobrą strategią do konstruowania szczepionek doustnych przeciwko wąglikowi (25).

Nowe możliwości otwiera zastosowanie roślin, w których zachodzi ekspresja PA do doustnego stosowania przeciwko wąglikowi. Obliczono, że 1 akr transgenicznego tytoniu ekspresjonującego PA mógłby dać produkcję o wielkości 360 milionów dawek oczyszczonej szczepionki wystarczającą do zaszczepienia całej populacji Stanów Zjednoczonych (10). W celu ekspresji antygeny PA stosowano m.in. tytoń i sałatę. Atrakcyjność takiej formy produkcji polega na tym, że nie trzeba tworzyć skomplikowanej infrastruktury, tak jak to ma miejsce w przypadku szczepionek AVA-Bio-Thrax, produkty są wolne od patogenów zwierzęcych i stymulują silną reakcję immunologiczną organizmu po podaniu doustnym.

DROGA DONOSOWA. Podanie donosowo (*IN–intranasal*) szczepionki w postaci suchego proszku chroniło króliki przed aerozolem ekspozycją *B. anthracis*

przez 9 tygodni, już po pojedynczej dawce szczepionki. Optymalna dawka szczepionki rPA w postaci suchego proszku podana królikom została wyznaczona eksperymentalnie i wynosiła 150µg. Króliki otrzymały pojedynczą dawkę 150µg rPA, 150µg rPA + 150µg skoniugowanego z peptydem reprezentującym otoczkę *Bacillus anthracis* oraz 150µg samego koniugatu.

Wszystkie preparaty zawierały MPL (*monophosphoryl lipid A*) i chitosan (*ChiSys*). Uzyskane wyniki wskazują, że donosowe podanie pojedynczej dawki szczepionki w postaci suchego proszku może chronić zwierzęta przeciwko zakażeniom aerozolem zarodnikami *B. anthracis* przez dziewięć tygodni (26).

Donosowe zakażenie nanoemulsją o wielkości cząsteczek 200-300 nm zawierającą wodę, olej sojowy, alkohol, czynnik powierzchniowo aktywny i rPA stymulowało odporność po 1 lub dwu podaniach, a zwierzęta przeżyły ekspozycję 1000 dawkami LD₅₀ *B. anthracis* (15, 27). Dalsze badania potwierdziły skuteczność podawania szczepionki drogą donosową, o czym świadczy fakt, że podanie tą drogą rPA w postaci mikrokapsulek z PLL (*poly L – lactide* 100-kDa) chroniło myszy przed aerozolem ekspozycją na zarodniki *B. anthracis* (28). Obiecujące wyniki doustnego stosowania szczepionki przeciwwąglikowej u zwierząt nie są jeszcze potwierdzone u ludzi.

DROGA NASKÓRNA. Poza doustną i donosową metodą podania antygenów w celach stymulowania odpowiedzi immunologicznej organizmu istnieje także równie efektywna droga immunizacji przez skórę, dzięki czemu antygen uzyskuje bezpośredni kontakt z komórkami Langerhansa, odgrywającymi dużą rolę w prezentacji antygeny i reakcji immunologicznej (10). Szczepienie myszy drogą naskórną (TDS - *transcutaneous delivery system*) z użyciem rPA, spowodowało pojawienie się długo utrzymujących się przeciwciał przeciwko PA, a po 46 tygodniach obserwowano 100% odporność zwierząt na zakażenie, przy czym poziom przeciwciał był tak wysoki jak przy uodparnianiu domięśniowym. W eksperymentach zamiast wodorotlenku glinu użyto HLT (*Heat Labile Toxin*) *E. coli* (10).

INNE CELE

Poza skoncentrowanymi badaniami nad szczepionkami zawierającymi PA obecnie zwraca się uwagę na inne antygeny, a wśród nich: glikoproteinę BcIA, S-layer – białka Ea1, SAP (7). Niezależnie od omówionych poszukiwań znalezienia skutecznej szczepionki i metody szczepienia przeciwko wąglikowi w ostatnim czasie odkryto przeciwciała monoklonalne MAB 1303, uzyskane po neutralizacji toksyny u transgenicznych myszy. Może ono zapewnić skuteczne leczenie poek-

spozycyjne, o czym świadczy fakt, że chroniło ono małpy przed aerozowym zakażeniem *B. anthracis* już po jednorazowym podaniu domięśniowym.

PODSUMOWANIE

Groźba użycia zarodników *B. anthracis* w atakach bioterrorystycznych przeciwko ludności na skalę masową niesie za sobą konieczność opracowywania skutecznej strategii walki z tym zagrożeniem. Poszukiwane są różne metody ochrony przed atakiem, a wśród nich, skuteczniejsze szczepionki i metody przeprowadzenia szczepień, zapewniających odporność, także w przypadku narażenia na szczepy *B. anthracis* odporne na antybiotyki. Dzięki zastosowaniu metod inżynierii genetycznej, proteomiki, a także lepszemu zrozumieniu mechanizmów zakażenia *B. anthracis* pojawiły się nowe możliwości, dające szansę na rozwiązanie wielu istotnych problemów na drodze do wyprodukowania skutecznej, bezpiecznej i łatwej do indywidualnego zastosowania szczepionki, stymulującej powstanie odporności przeciwko zarodnikom, formom wegetatywnym i toksynom *B. anthracis*.

PIŚMIENNICTWO

- Grabenstein JD, Countering anthrax: vaccines and immunoglobulins. *Vaccines Clin Infect Dis* 2008; 46(1):129 - 36.
- Bielawska-Drózd A, Niemcewicz M, Bartoszcze M. The evaluation of methods for detection of *Bacillus anthracis* spores in artificially contaminated soil samples. *Polish J Environ Stud* 2008; 17(1): 5-10.
- Bielawska-Drózd A, Bartoszcze M. Występowanie przetrwalników *Bacillus anthracis* w środowisku. *Med Wet* 2007; 63(8): 946-950.
- Mourez M, Kane RS, Mogridge J, i in. Designing a polyvalent inhibitor of anthrax toxin. *Nat Biotechnol* 2001; 19(10):961-985.
- Brey RN, Molecular basis for improved anthrax vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57:1266-1292.
- Gu ML, Leppla SH, Klinman DM. Protection against anthrax toxin by vaccination with a DNA plasmid encoding anthrax protective antigen. *Vaccine* 1999; 17:340-4.
- Little SF, Anthrax vaccines. *Biodrugs* 2005; 19 (4): 233-245.
- Ivins BE, Fellows PF, Pitt MLM, i in. Efficacy of a standard human anthrax vaccine against *Bacillus anthracis* aerosol spore challenge in rhesus monkeys. *Salisbury Med Bull* 1996;87:125-126.
- Singer DE, Schneerson R, Bautista CT, i in. Serum IgG antibody response to the protective antigen (PA) of *Bacillus anthracis* induced by anthrax vaccine adsorbe (AVA) among U.S. military personnel. *Vaccine* 2008; 26(7):869-873.
- Baillie LWJ, Past, imminent and future human medical countermeasures for anthrax. *J Appl Microbiol* 2006;101:594-606.
- Wang JY, Roehrl MH. Anthrax vaccine design: strategies to achieve comprehensive protection against spore, bacillus and toxin. *Medical Immunology* 2005; 4:4:1-8.
- Garmory HS, Titball RW, Griffin KF, i in. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium expressing a chromosomally integrated copy of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene protects mice against an anthrax spore challenge. *Infect Immun* 2003; 71(7) 3831-3836.
- Chichester JA, Musiychuk K, de la Rosa P, i in. Immunogenicity of a subunit vaccine against *Bacillus anthracis*. *Vaccine* 2007; 25:3111-3114.
- Xu Q, Zeng M. Detoxified lethal toxin as a potential mucosal vaccine against anthrax. *Clin Vac Immunol* 2008;15(4):612-616.
- Kolla RV, Chintalapati S, Sabet M, i in. Complement C3d conjugation to anthrax protective antigen promotes a rapid, sustained and protective antibody response. *PLoS ONE* 2007; 2(10):1-11.
- Fasanella A, Tonello F, Garofolo G, i in. Protective activity and immunogenicity of two recombinant anthrax vaccines for veterinary use. *Vaccine* 2008;26:5684-5688.
- Zhang Y, Qiu J, Zhou Y, i in. Plasmid-based vaccination with candidate anthrax vaccine antigens induces durable type 1 and type 2 T-helper immune responses. *Vaccine* 2008; 26: 614-622.
- Luxembourg A, Hannaman D, Nolan E, i in. Potentiation of an anthrax DNA vaccine with electroporation. *Vaccine* 2008;26:5216-5222.
- Yan M, Roehrl MH, Basar E, i in. Selection and evaluation of the immunogenicity of protective antigen mutants as anthrax vaccine candidates. *Vaccine* 2008; 26(7):947-955.
- Liu YT, Lin SB, Huang CP, i in. A novel immunogenic spore coat-associated protein in *Bacillus anthracis*: characterization via Proteomics approaches and a vector-based vaccine system. *Protein Exp Purif* 2008; 57(1):72-80.
- DelVecchio VG, Connolly JP, Alefantis TG, i in. Proteomic profiling and identification of immunodominant spore antigens of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(9): 6355-6363.
- Chitlaru T, Gat O, Grosfeld H, i in. Identification of in vivo-expressed immunogenic proteins by serological proteome analysis of the *Bacillus anthracis* secretome. *Infect Immun* 2007;75(6):2841-285.
- Walz A, Mujer CV, Connolly JP, i in. *Bacillus anthracis* secretome time course under host-simulated conditions and identification of immunogenic proteins. *Proteome Science* 2007;5:11:1-10.
- Mohamadzadeh M, Duong T, Sandwick S J, i in. Dendritic cell targeting of *Bacillus anthracis* protective antigen expressed by *Lactobacillus acidophilus* protects mice from lethal challenge. *PNAS* 2009;106(11): 4331-4336.
- Baillie LW, Rodriguez AL, Moore S, i in. Towards a human oral vaccine for anthrax: The utility of *Salmonella*

- typhi* Ty21 a - based prime-boost immunization strategy. *Vaccine* 2008;26:6083-6091.
26. Klas SD, Petrie CR, Warwood SJ, i in. A single immunization with a dry powder anthrax vaccine protects rabbits against lethal aerosol challenge. *Vaccine* 2008;26:5494-5502.
27. Anthrax vaccine produces immunity with nanoparticles, not needles [editorial]. *Nanosingularity* 2007;18:1-2.
28. Flick-Smith HC, Eyles JE, Hebdon R, i in. Mucosal or parenteral administration of microsphere-associated *Bacillus anthracis* protective antigen protects against anthrax infection in mice. *Infect Immun* 2002;70(4):2022-2028.

Otrzymano: 3.08.2009r.

Zaakceptowano do druku: 23.09.2009 r.

Adres do korespondencji:

mgr Dorota Żakowska

Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych, WIHiE

ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy,

e-mail: dzakowska@yahoo.com