

POKROKY VE VÝVOJI VAKCÍN PROTI HIV, TUBERKULÓZE A MALÁRII

PETRA GRZNÁROVÁ a JAN LIPOV

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6
petra.grznarova@vscht.cz

Došlo 20.10.09, přijato 18.2.10.

Klíčová slova: vakcíny, HIV, malárie, tuberkulóza

Obsah

1. Úvod
2. HIV vakcíny
3. Vakcíny proti tuberkulóze
4. Vakcíny proti malárii
5. Závěr

1. Úvod

Onemocnění AIDS a tuberkulóza jsou již několik let na nejvyšších pozicích v seznamu příčin úmrtí ve světě. Tuberkulóza byla v roce 2005 příčinou úmrtí 1,6 mil lidí¹. Onemocnění AIDS bylo příčinou úmrtí 2 mil lidí v celosvětovém měřítku v roce 2007, z čehož bylo 270 000 dětí. Za tentýž rok přibýlo dalších 2,7 mil nově infikovaných osob ke 33 mil již evidovaných HIV pozitivních osob². Malárie celosvětově ohrožuje 3 mld lidí ve více než 109 zemích. Více než 250 mil lidí již na malárii trpí, u více než 1 mil pacientů ročně vede k smrti^{3,4}.

Vakcinace (z lat. vacca – kráva, protože první vakcína byla založena na očkování lidí kravskými neštovicemi) je nejúčinnější způsob, jak předcházet infekčním chorobám. První zmínky o využití vakcín se objevují již v období 200 let př. n. l. v Číně. První dokumentovanou vakcinaci (proti pravým neštovicím) provedl v roce 1796 anglický lékař Edward Jenner. Nové objevy v mikrobiální patogenezi a imunologii vedly v posledních letech k renesanci ve výzkumu a vývoji vakcín. Komerčním a zároveň technologickým úspěchem byla např. příprava vakcíny Prevenar, která je určena k prevenci pneumokokových infekcí u novorozenců a batolat. Jde o konjugát bakteriálních polysacharidů ze *Streptococcus pneumoniae* a proteinu CRM197 (z angl. cross reacting material), což je nefunkční varianta bakteriálního toxinu z *Corynebacterium diphtheriae*. Tato kombinace vedla ke stimulaci produkce IgG protilátek. Další vývoj v této oblasti se soustřeďuje na výzkum vakcín ve formě 12 a více valentních glykokonjugátů, které by poskytovaly komplexnější ochranu⁸. Dalším příkladem

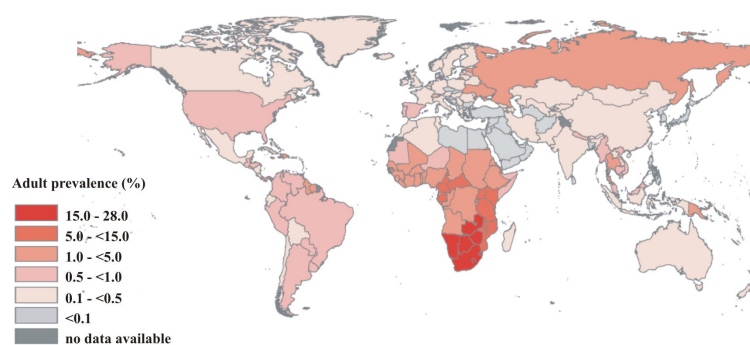
jsou vakcíny Cervarix a Gardasil (v České republice distribuována pod názvem Silgard), které byly světovou zdravotnickou organizací doporučeny k celoplošné prevenci. Divalentní vakcína Cervarix je určena k prevenci premaligních cervikálních lézí a karcinomu děložního hrdla, zatímco tetravalentní vakcína Gardasil/Silgard zahrnuje prevenci premaligních genitálních lézí (cervikálních, vulválních a vaginálních), karcinomu děložního hrdla a genitálních bradavic. Cervarix obsahuje rekombinantní kapsidové proteiny lidských papilomavirů (L1 proteiny HPV) typů 16 a 18 složených do viru podobných částic, konjugovaných s adjuvans. Gardasil/Silgard vakcína obsahuje L1 proteiny HPV typů 6, 11, 16 a 18 v téže formě^{9,10}. Hladiny protilátek po aplikaci obou vakcín jsou nesrovnatelně větší než protilátková odpověď po přirozené infekci. Příprava antigenů ve formě virům podobných částic nebo syntéza modifikovaných adjuvans poukazují na vysoký potenciál tohoto odvětví farmakologie a jsou výzvou a impulsem pro farmaceutický průmysl k vývoji vakcín proti široké škále onemocnění jako je malárie, tuberkulóza, meningitida typu B, hepatitida typu C, chlamydiové infekce a v neposlední řadě také k vývoji vakcíny proti mnoha subtypům chřipky.

Bezpečnost a efektivita očkovací látky závisí na způsobu přípravy a na jejím složení.

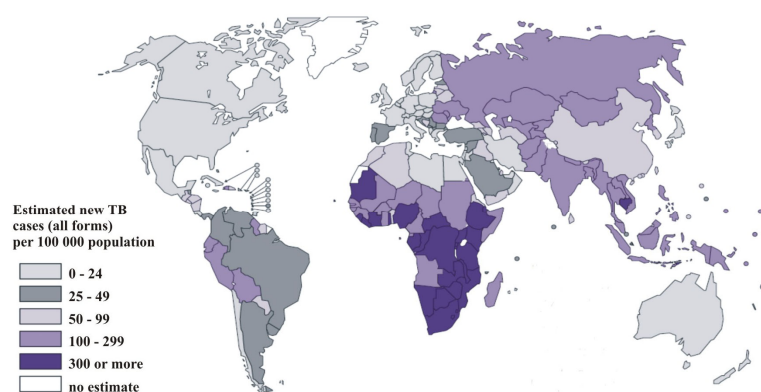
Očkovací látky, které jsou momentálně v klinickém použití, jsou několika typů:

- Inaktivované vakcíny, které jsou připraveny usmrcením příslušného patogenu teplem nebo chemicky. Očkovací látka je stabilní, ale kvůli relativně slabé imunitní odpovědi je nutné vakcínu podat vícekrát.
 - Příkladem tohoto typu vakcíny je buněčná vakcína proti černému kašli či vakcína proti chřipce.
 - Živé (atenuované) vakcíny, které jsou připraveny kultivací patogenu tak, aby ztratil svou virulenci. Imunitní odpověď organismu po imunizaci tímto typem očkovací látky je dobrá, v tomto případě jsou ale zvýšené nároky na skladování a teoretická možnost zpětné mutace do virulentní podoby. Proto se tento typ vakcín nepodává osobám s oslabenou obranyschopností. Příkladem je vakcína proti tuberkulóze, spalničkám, zarděnkám a příušnicím.
 - Toxoid (anatoxin) je molekula toxinu zbavená toxicity, přičemž její antigenní aktivita je zachována. Toxoidy vznikají spontánně nebo je možné strukturu výchozí molekuly změnit chemicky, např. formalínem. Příkladem tohoto typu vakcíny je očkovací látka proti tetanu či záškrtu.
- Mezi tzv. moderní vakcíny, patří:
- Konjugované vakcíny, které jsou založeny na konjugaci polysacharidového antigenu s proteinovým nosičem (tetanický nebo difterický toxoid). Příkladem je očkovací látka proti *Haemophilus influenzae* typu B.
 - Subjednotkové vakcíny obsahují pouze určitou složku

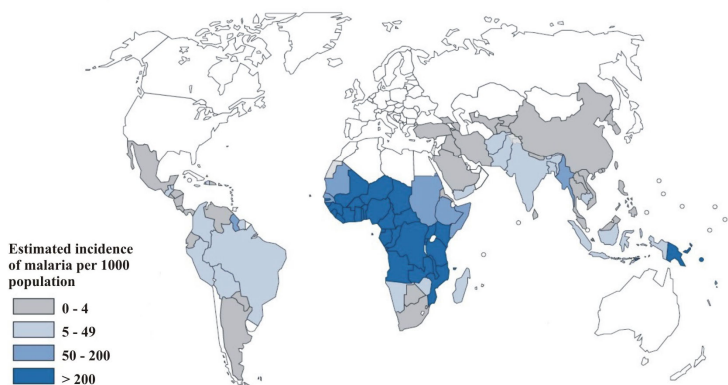
a



b



c

Obr. 1. Přehled prevalence a incidence a) AIDS⁵, b) tuberkulózy⁶ a c) malárie⁷ ve světě ke konci roku 2006

patogenní částice, která vyvolává imunitní odpověď a má imunizační vlastnosti. Eliminací reziduálních složek celého mikroorganismu se snižuje četnost nežádoucích účinků. Příkladem je vakcína proti hepatitidě

B (ENGERIX-B).

Vakcíny, které jsou zatím experimentální:

- DNA vakcíny. V zásadě se jedná o terapeutický gen, který je po vstupu do buňky exprimován za produkce

imunogenního proteinu patogenního mikroorganismu, např. povrchového glykoproteinu. Pro zajištění požadované koncentrace proteinu je terapeutický gen vložen do vektoru za silný virový promotor. Konstruovány jsou také multicistronní vektory pro expresi několika imunogenních či imunomodulačních proteinů zároveň¹¹. Imunomodulační proteiny jsou nezbytné pro regeneraci a zachování kondice buněk imunitního systému. Pro produkci vektoru slouží bakteriální buňky. Po namnožení v bakteriích jsou vektory zpravidla převedeny do fyziologického roztoku, ve kterém jsou injektovány pod kůži nebo do svalů.

Genová děla, kde jsou molekuly DNA přichyceny na povrchu zlatých či wolframových mikročástic, které jsou urychleny stlačeným héliem a nastřelovány do cílových buněk, jsou zatím jenom laboratorní technikou¹². Alternativní metodou je aplikace aerosolu na nosní, plicní, oční nebo vaginální sliznici^{11,13}.

- Rekombinantní vektorové vakcíny, ve kterých se gen pro příslušný antigen patogenu inkorporuje do genomu neškodného mikroorganismu – nosiče. V této formě je látka očkováána do organismu, kde nosič produkuje kromě svých proteinů i proteiny odpovídající vnesenému genu. Vznikne imunita proti patogenu. Nosičem genu může být např. virus vakcinie, poliovirus, BCG nebo nepatogenní salmonela.

Zajímavý experiment byl popsán autory Silva a spol., kteří transfekovali myší monocyty retrovirovým vektorem obsahujícím gen pro expresi hsp65 (z angl. heat-shock protein) *Mycobacterium leprae*. Antigen byl exponován na povrchu transfekovaných buněk spolu s MHC třídy I a II. Tyto buňky byly injektovány myším, u kterých byla po aplikaci pozorována odolnost po expozici BCG a *Mycobacterium tuberculosis*¹⁴.

Vakcíny, které se vyvíjejí a používají v poslední době, byly navrženy tak, aby obsahovaly co nejméně cizorodých antigenních látek a tudíž aby zatížení organismu bylo co nejmenší, zároveň musí být samozřejmě schopné vyvolat účinnou imunitu proti příslušnému patogenu. Příprava nových typů vakcín je nezbytná i proto, že pro některá infekční agens nelze použít atenuovanou či inaktivovanou formu pro jejich onkogenní potenciál a také proto, že některé mikroorganismy nelze kultivovat v klasických podmínkách.

Následující část se týká přípravy různých typů vakcín a pokroku ve vývoji očkovacích látek proti významným patogenům různých typů od virů přes bakterie po parazity způsobující AIDS, tuberkulózu a malárii.

2. HIV vakcíny

HIV (*Human immunodeficiency virus*), který způsobuje syndrom získaného selhání imunity (AIDS) řadíme do VI. skupiny virů, tj. virů obsahujících jednořetězcovou RNA a reverzní transkriptasu. Systematicky náleží HIV do čeledi *Retroviridae*, podčeledi *Orthoretrovirinae* a rodu

Lentivirus. Na základě změn v genetické informaci rozdělujeme HIV na dva typy: HIV-1 a HIV-2. Typ HIV-1 je dělen na 4 skupiny: M, O, N a P. Skupina M obsahuje zatím 9 subtypů, a to A, B, C, D, F, G, H, J a K. V posledních letech se hovoří i o subtypech E a I, které se ale zatím podařilo izolovat jenom v rekombinantní podobě s jiným subtypem.

K infekci dochází tělními tekutinami nakažených osob (krev, vaginální sekret, sperma, mateřské mléko). Vstup viru do cílové buňky zajišťuje povrchový glykoprotein (Env; z angl. envelope). Má dvě podjednotky, gp120 (povrchová podjednotka – SU, z angl. surface unit) a gp41 (transmembránová podjednotka – TM, z angl. transmembrane unit). Na vnějším povrchu virové membrány jsou proteiny gp120 a gp41 spojeny nekovalentními interakcemi¹⁵. Povrchová podjednotka (gp120) je zodpovědná za specifickou interakci s povrchovým glykoproteinem CD4 exponovaným na povrchu T-lymfocytů. V důsledku vazby proteinu gp120 na molekulu CD4 dochází ke konformační změně gp120 a odkrytí vazebného místa pro koreceptor (CCR5 nebo CXCR4)^{16,17}.

Po interakci viru s receptorem a koreceptorem dochází k řadě konformačních změn, jejichž výsledkem je membránová fúze a uvolnění virového jádra do cytoplasmy cílové buňky¹⁸. Po rozpadu virového jádra je spuštěn proces reverzní transkripce, kterým je syntetizována dvouřetězcová virová DNA. Reverzní transkripce probíhá v cytoplasmě v tzv. nukleoproteinovém komplexu. Po jejím ukončení je celý tzv. preintegrační komplex (PIC), tvořený DNA, IN (integrasa), RT (reverzní transkriptasa) a zřejmě i MA (matrixový protein), Vpr (z angl. viral protein R) a NC (nukleoprotein), transportován k jaderným póřům (cit.^{19–22}). Následkem specifických interakcí s proteiny lokalizovanými na vstupu do jaderného póru dochází k rozpadu PIC a průniku provirové DNA do jádra, kde je za pomoci integrasy inkorporována do hostitelského genomu. Po aktivaci proviru dochází za účasti hostitelské DNA polymerasy k transkripci provirové DNA. Vzniklé molekuly RNA, nesestřížené i sestřížené, jsou transportovány do cytoplasmy. Nesestřížená RNA vystupuje buď jako mRNA, ze které na volných polysomech vznikají polyproteinové produkty Gag, Gag-Pro a Gag-Pro-Pol, nebo jako genomová RNA nově se formující virové částice. Sestřížené molekuly RNA slouží jako mRNA kódující Env a regulační proteiny Vif, Vpr, Tat, Nef, Rev a Vpu²³.

Translací *env* na drsném endoplasmatickém retikulu (ER) vzniká polyproteinový prekurzor Env, který je v ER (endoplasmatické retikulum) štěpen za vzniku SU a TM. Tyto podjednotky jsou poté transportovány k cytoplasmatické membráně (CM) a exponovány na jejím povrchu. Polyproteinové prekurzory Gag a Gag-Pro-Pol jsou také transportovány k CM, kde dochází k jejich multimerizaci a vytvoření nezralé virové částice, která po vazbě na komplex SU a TM pučí ven z buňky. Viry touto cestou získávají vnější obal odvozený od CM hostitelské buňky. Zrání viru, tj. přestavba virového jádra (z angl. core), probíhá po oddělení viru od hostitelské buňky, a je způsobeno proteolytickým štěpením polyproteinů Gag a Gag-Pro-Pol.

HIV byl objeven před více než 25 lety a v dnešní době víme mnoho o jeho struktuře a imunopatogenezi. Byly pozorovány různé vlastnosti HIV, jako je mimořádná genetická diverzita, způsobená vysokou frekvencí chyb při transkripci virového genomu, nebo jeho schopnost postupně eliminovat imunitní odpověď hostitele. Nebyl pozorován žádný příklad imunity proti HIV, který by mohl být (podobně jako u ostatních známých virů) základem pro vývoj vakcíny. Od osmdesátých let bylo skutečně více než 95 klinických testů různých HIV vakcín na více než 26 000 dobrovolnících, žádná ovšem neposkytla uspokojivý výsledek²⁴.

V současné době probíhá zajímavá studie, a to testování vakcíny obsahující virus ptačích neštovic. Virus ptačích neštovic (ALVAC) je znám svou vysokou imunogenitou, a proto byl použit jako vektor pro produkci HIV vakcín. Do vektoru byly vloženy různé kombinace genů z HIV: *env*, *gag*, *pol* a *nef*. Pět kombinací bylo testováno na dobrovolnících. Do druhé fáze klinických testů byl zařazen konstrukt ALVAC vCP205 obsahující geny pro *env* (gp120, gp41), *gag* a *pol*. Byla pozorována tvorba cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytů, které průkazně zpomalují průběh infekce²⁵. Byla také prokázána bezpečnost a imunogenita vakcíny²⁶.

Vakcínou ve třetí fázi klinických testů je Retanef, tvořený adenovirovým vektorem s vloženými geny *rev*, *tat*, *nef*, *gag*, *pol* a *env* HIV-1 subtypu B, která je testována v USA a Austrálii. Vakcína schopná indukovat rozsáhlou produkci CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů umožňuje dlouhodobou kontrolu nad průběhem infekce^{27,28}.

Další z řady rekombinantních vakcín je očkovací látka, jejímž základem je genová modifikace viru vakcinie Ankara (pasážováním viru v kuřecích buňkách virus ztratil 10 % svého genomu a tím i schopnost replikace v buňkách primátů a pro klinické použití je tedy zejména z hlediska bezpečnosti velmi zajímavý), která vede k produkci polyproteinu Gag a několika epitopů HIV indukujících tvorbu cytotoxických T lymfocytů. Tato očkovací látka byla roku 2001 uvedena do první fáze klinických testů v Anglii a Keni³⁵.

V současnosti je licencováno několik vakcín obsahujících povrchové glykoproteiny, které jsou esenciální pro přichycení viru k hostitelské buňce a průnik viru do buňky. Již zmiňovaným problémem ve vývoji vakcín proti HIV je především diverzita viru a chybovost RT, což se projevuje vysokou variabilitou a konformační flexibilitou povrchových glykoproteinů a tedy rychlou selekcí rezistentního viru u léčených pacientů.

Mnohé HIV vakcíny jsou navrženy a vyvíjeny tak, aby po jejich aplikaci do organismu byly imunitním systémem produkovány protilátky proti gp120. V roce 2008 byla spuštěna první fáze klinických testů s vakcínou, která má vyvolat produkci protilátek proti třem celosvětově významným HIV subtypům³³. Epitopy na gp120 jsou vysoce imunogenní a tvoří se proti nim velmi účinné protilátky. Na povrchu virionu se ovšem protein gp120 nachází ve formě trimery, což může bránit interakci protilátky s epitopem. Navíc jsou interakce mezi jednotlivými molekulami

v trimery podstatně silnější než vazba protilátky na epitop, takže k interakci protilátky a epitopu nemůže dojít. K rozvolnění trimery dochází až po interakci s CD4 receptorem v důsledku konformačních změn, to je už ale na neutralizaci protilátkou pozdě¹⁷. Řešením by mohlo být využití poznatků ze strukturní biologie pro navržení a vytvoření struktur napodobujících epitopy povrchových glykoproteinů HIV, které indukují tvorbu protilátek proti těmto strukturám.

Třetí fáze klinických testů bude v dohledné době ukončena u produktu AIDSVax B/B, který obsahuje sekvence pro obalové glykoproteiny izolované z virů interagujících s koreceptory CCR5 (cit.²⁹). Druhá fáze klinických testů neprokázala výraznější účinek této vakcíny. V současné době jsou očekávány výsledky z třetí fáze testování v Thajsku^{30–32}.

V rámci projektu AIDS Vaccine Integrated Project (AVIP) bylo navrženo několik vakcín založených na poznatcích, že Tat a Nef jsou na jedné straně induktory exprese cytokinů a chemokinů (signální molekuly sehrávající roli v mezibuněčné komunikaci) v infikovaných buňkách a na straně druhé jako extracelulární proteiny působí jako chemoatraktanty (indukují pohyb buněk ve směru rostoucí koncentrace chemoatraktantu) pro cílové buňky HIV, čímž zvyšují úspěšnost infekce. Byly navrženy 4 typy vakcín. Základ vakcíny s označením 1-Tat + ΔV2Env tvoří kombinace časného regulačního virového antigenu Tat s povrchovým glykoproteinem Env. Označení ΔV2 představuje deleci první hypervariabilní oblasti označované jako "V2 loop". Tato delece způsobuje expozici jinak málo přístupných konzervovaných aminokyselinových sekvencí Env, které participují v interakci Env s CD4 receptorem a příslušným koreceptorem. Tat protein slouží jako antigen a aktivátor imunitní odpovědi. Očekávaným výsledkem imunizace touto vakcínou je produkce specifických protilátek a indukce CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytů. Výsledky první fáze klinických testů prokázaly významnou produkci protilátek. Vakcína s označením 2-Nef + ΔV2Env je založena na kombinaci časného regulačního proteinu Nef a trimery ΔV2Env. Proti produktu genu *nef* jsou po imunizaci vakcínou v organismu tvořeny protilátky anti-Nef a protilátky proti konzervovaným aminokyselinovým sekvencím Env. Organismus tak získal obranyschopnost proti časné i pozdní fázi replikačního cyklu viru. Výsledky z první fáze klinických testů prokázaly bezpečnost vakcíny a také významnou imunitní odpověď. Základem očkovací látky s označením 3-multi-HIV antigens/epitops je kombinace genů pro regulační proteiny Nef, Tat a Rev, genů pro Gag produkty MA a p24 a DNA kódující několik epitopů z RT, virové proteasy a Env proteinu. Tato očkovací látka byla doplněná GM-CSF, což je cytokin, růstový faktor bílých krvinek, který má v tomto případě adjuvanční efekt. Látka zatím nebyla klinicky testována. Poslední navrženou vakcínou v rámci programu AVIP je látka s označením 4-HIV multigene. Jejím základem je plasmidová DNA obsahující geny *nef*, *tat*, *rev*, *gag* a geny pro několik epitopů Env a RT. Po aplikaci očkovací látky se předpokládá spuštění tvorby cytotoxických T lymfocytů. Látka zatím nebyla

klinicky testována³⁴.

Dosavadní úspěchy na poli boje proti HIV nespočívají v léčení infekce, ale spíše v omezení výskytu a projevu příznaků a též v omezení šíření viru v populaci²⁴. Za posledních pár let bylo vyvinuto mnoho pokusných HIV vakcín, které vyvolaly silnou imunitní odpověď a následně odolnost proti HIV u zvířecích modelů. Některé z nich budou nebo již byly zařazeny do klinických testů³⁵.

3. Vakcíny proti tuberkulóze

Bakterii *Mycobacterium tuberculosis*, která je původcem tuberkulózy, řadíme do řádu *Actinomycetales* a rodu *Mycobacterium*. Jedná se o obligátně aerobní tyčinky, za jejichž objev byla Robertu Kochovi v roce 1905 udělena Nobelova cena.

Neurčité zařazení *M. tuberculosis* na základě Gramova barvení a také zvýšená rezistence k desinfekčním a terapeutickým přípravkům je patrně způsobena odlišnostmi ve složení buněčné stěny, a to především přítomností kyseliny mykolové.

Zdrojem infekce je nakažený člověk, přičemž infekční částice se šíří pomocí malých kapének, které zůstávají v prostředí infekční po dlouhou dobu, pokud nejsou vystaveny přímému slunečnímu záření. Vdechnuté infekční částice pronikají do terminálních plicních sklípků, kde dochází k rozvoji primární infekce³⁶. Po vstupu *M. tuberculosis* do organismu byly popsány tři typy reakce. V ideálním případě dojde ke spontánnímu uzdravení, tj. po prokazatelném proniknutí infekčních částic nebyla detegována infekce, a to ani v latentní formě. Bohužel zatím není znám molekulární mechanismus tohoto procesu. Dalším typem je latentní stadium, u kterého ovšem může dojít k reaktivaci v důsledku oslabení imunitního systému. Posledním typem je akutní infekce, která se projevuje ihned po vstupu *M. tuberculosis* do organismu osob s oslabeným imunitním systémem (AIDS, posttransplantační léčba)³⁷.

V plicních sklípcích dochází k fagocytose infekční částice *M. tuberculosis* pomocí makrofágů. V důsledku tvorby kyslíkových radikálů aktivovanými makrofágy v nich nemůže probíhat pomnožení patogenu, ale v mnoha případech nedochází ani k jeho usmrcení. Navíc jsou infekční částice umístěny ve fagosomech, přičemž brání jejich maturaci, tedy splynutí fagosomu s lysosomem za vzniku fagolysosomu, a vytvoření pro virus smrtícího prostředí. Potlačení maturace fagosomů ale není úplně a část populace *M. tuberculosis* je usmrcena³⁸. Mechanismus tohoto procesu zatím nebyl u makrofágů objasněn.

Je známo, že makrofágy jsou iniciátory specifické imunitní odpovědi jako buňky prezentující antigen³⁹. Makrofágy na svém povrchu exponují bakteriální glykolipidy. Prezentace bakteriálně specifických antigenů na povrchu makrofágu probíhá v kontextu s antigeny MHC I i MHC II molekul. Bakteriální antigeny se po degradaci uvnitř fagolysosomu vážou v endosomálních kompartmentech (antigen-prezentující buňky) na MHC II molekuly. Vzniklé komplexy migrují k buněčné membráně buňky a jsou

exponovány na jejím povrchu. Exponované bakteriální antigeny na povrchu makrofágů vedou k aktivaci CD4+ a CD8+ lymfocytů. K aktivaci makrofágů dochází uvolněním interferonu γ (INF γ), který je produkován některými populacemi T-lymfocytů, a spolu s TNF α (*z angl.* tumor necrosis alpha) mají synergický účinek. Lymfocyty CD4+ začnou produkovat lymfotoxin α , zatímco lymfocyty CD8+ a $\gamma\delta$ (aktivované fragmenty mykobakteriálních lipidů, které vznikají v endozomálních/lysozomálních organelech) produkují perforin a granulysin, jež přímo usmrcují *M. tuberculosis* uvnitř makrofágů⁴⁰. Tímto způsobem je infekce kontrolována a lokalizována v tzv. granulózniích lézích. Oslabením imunitního systému dochází ke ztrátě imunologického dohledu, rozvolnění granulomů a uvolnění *M. tuberculosis* do krevního oběhu a tím k přenosu do dalších tkání a orgánů (kosti, mozek, ledviny, žlázka postihuje také srdce, kosterní svaly, pankreas a štítnou žlázu)⁴¹.

Po desetiletích zanedbávání prevence je v dnešní době výskyt tuberkulózy (TBC) opět alarmující, obzvláště když se začínají objevovat kmeny *M. tuberculosis* rezistentní k většině dnes dostupných léků⁴². Jedna třetina světové populace je infikována latentní formou *M. tuberculosis*. Globálně též roste incidence TBC, a to především v souvislosti se šířením HIV, asi 13 % HIV pozitivní africké populace je koinfikováno *M. tuberculosis*⁴³. Z hlediska prevence má velký význam vakcína *Mycobacterium bovis* nazvaná Bacillus Calmette-Guérin (BCG), vyvinutá na počátku minulého století. Tato vakcína je účinná při imunizaci novorozenců, ale není účinná při prevenci plicních onemocnění u dospělých jedinců⁴⁴. V současné době je snaha nahradit BCG vakcínu novou, efektivnější očkovací látkou nebo vyvinout „podpůrnou“ vakcínu, která by účinně stimulovala imunitní odpověď u dospělých. Mezi vhodné kandidáty nahrazující klasickou BCG vakcínu řadíme rekombinantní očkovací látky V1 a V2 (viz tab. I). Antigen 85B (Ag85B) je klíčovou složkou V1 (cit.^{45–48}). Tento dobře prostudovaný enzym o velikosti 30 kDa, který se účastní syntézy buněčné stěny *M. tuberculosis*, je u V1 nadprodukovan a účinně sekretován. V1 již prošla první fází klinických testů a je velkým příslibem do budoucna. V2 je mutantem BCG, ve kterém je exprimován listeriolysin, který perforuje membránu fagosomu. Navíc byl u tohoto mutantu odstraněn gen pro ureasu, která zvyšuje pH ve fagosomu. Tímto krokem se předešlo případné neutralizaci fagosomu a snížení aktivity listeriolysinu. U experimentálních zvířat byla po vakcinaci a následné infekci pozorována apoptóza infikovaných makrofágů⁴⁹. První fáze klinických testů byla spuštěna koncem roku 2007.

Mezi potenciální „podpůrnou“ vakcíny řadíme vakcíny V3, V4 a V5. Vakcína V3 je připravena ze dvou antigenů *M. tuberculosis* Ag85B a ESAT-6 (*z angl.* early secretory antigenic target). Oba antigeny jsou silně imunogenní^{50,51}. V současnosti je protein ESAT6 používán také jako klíčová složka nové generace diagnostických testů pro detekci *M. tuberculosis*⁵². První fáze klinických testů s V3 již proběhla v Holandsku, přičemž pacientům byla podána vakcína V3/IC31, kde IC31 značí použité adjuvans. Vakcína

Tabulka I
Přehled vakcín proti tuberkulóze s jejich původním označením

Vakcíny	Název	Obsažená modifikace/antigen	Fáze klinických testů	Označení v textu
Rekombinantní vakcíny	rBCG30	antigen 85B	I. fáze	V1
	rBCG Δ ureC:Hly	lysteriolysin, odstraněn gen pro ureasu	I. fáze	V2
Podpůrné vakcíny	Ag85B-ESAT6/TB10.4	antigen 85B, antigen ESAT-6	I. fáze ukončena	V3
	<i>M. tuberculosis</i> 72f	antigen Rv1196, antigen Rv0125	I. fáze	V4
	MVA85A	modifikovaný Ankara virus, antigen 85B	I. fáze	V5

byla shledána bezpečnou a silně imunogenní⁵³. Vakcína V4 obsahuje dva antigeny (Rv1196, Rv0125), které jsou velmi zajímavým cílem pro pomocné T-lymfocyty⁵⁴. Vakcína V4/AS02A (adjuvans AS02A) byla podána pacientům v první fázi klinických testů. Byla pozorována dobrá tolerance a také indukce jak humorální, tak buněčné imunitní odpovědi. Vakcína V5 je založena na genové modifikaci viru vakcinie Ankara, která vede k expresi antigenu 85A (člen rodiny Ag85 antigenů). V první fázi klinických testů byla pozorována dobrá tolerance a silná indukce imunitní odpovědi⁵⁵.

Díky silné intervenci celosvětově uznávaných organizací (WHO, EU) se v oblasti prevence TBC dělají zejména v posledních několika letech značné pokroky⁵⁶.

4. Vakcíny proti malárii

Malárie je způsobena prvokem *Plasmodium falciparum*, přenášeným samičkou komára rodu *Anopheles*. K přenosu prvoka dochází slinami infikovaného komára. Během několika minut od kousnutí, kterým se do krevního řečiště uvolní sporozoity (rané vývojové stádium), je možné identifikovat rozvíjející se schizonty (neinfekční stádium životního cyklu prvoka charakteristické rychlým dělením) v hepatocytech. Toto stádium infekce je bez pozorovatelných příznaků. Růst schizontů vede k ruptuře hepatocytů a uvolnění merozoitů (infekční „produkty“ asexuální reprodukce schizontů v hepatocytech) do krve hostitele, kde jsou infikovány erythrocyty. Klinickými symptomy této fáze jsou záchvaty horečky každé 3 nebo 4 dny, což odpovídá hromadnému uvolňování merozoitů z krevních buněk. Po infekci erythrocytů přechází stádium merozoitů do stádia trofozoitů. Část populace trofozoitů pokračuje do schizogenního cyklu (asexuální reprodukce) a druhá část populace přechází do sexuální fáze. V této fázi vznikají mikrogametocyty (samčí) a makrogametocyty (samičí), které jsou uvolněny do krve hostitele a s ní se dostávají do těla komára, kde v jeho střevě proběhne fáze oplodnění (mikrogametocyty vnikají do makrogametocytů), vzniknou nové sporozoity, které jsou krví transportovány do slinné

žlázy^{57–62}.

Jednou z možností, jak podpořit rozvoj imunity proti malárii, je často po sobě následující expozice cílového organismu. Přesná povaha imunitní odpovědi (antigenní specifita a rozsah), která přímo redukuje populaci plasmodia v organismu, resp. působí preventivně proti malárii, je zatím neznáma a často simulována jenom na zvířecích modelech. V poslední době se za velmi nadějnou považuje očkovací látka s označením RTS,S (v spojení s AS02 adjuvans). Tato vakcína obsahuje části CSP proteinu (z angl. circumsporozoite protein) a epitopy T-lymfocytů spojené s komponenty povrchového antigenu hepatitidy B tak, že dochází k tvorbě imunogenních částic. Klinické studie prokázaly 34% účinnost při prevenci u dospělých pacientů (studie prováděná v Gambii) a 30% účinnost u dětí (studie prováděná v Mozambiku)⁶³. Předpokládaným mechanismem účinku této vakcíny je tvorba protilátek proti sporozoitům, které rozpoznají hepatocyty infikované plasmodiem. Pro dosažení vyšší produkce T-lymfocytů se osvědčilo kombinování dvou vektorů: FP9 (drůbeží neštovice, z angl. fowlpox virus) a MVA (modifikovaný virus vakcinie Ankara), které obsahovaly sekvenci jednoho z antigenů: TRAP (z angl. thrombospondin-related adhesive protein) a CSP. Oba se účastní vstupu sporozoitů do hepatocytu^{64–66}. První testy obou vakcín byly provedeny ve Velké Británii a prokázaly signifikantní tvorbu T-lymfocytů a 82% redukci napadených hepatocytů⁶⁶. V první a druhé fázi klinických testů je momentálně vakcína založená na adenovirovém vektoru exprimujícím CSP a AMA1 (z angl. apical membrane antigen) antigen^{67,68}. V druhé fázi klinických testů je též vakcína obsahující kombinaci MSP-1 a MSP-2 (z angl. merozoite surface proteins) s RESA proteinem (z angl. ring-stage-infected erythrocyte surface antigen) z *P. falciparum* a Montadine ISA 720 adjuvans. Testy u 5–9letých dětí z Papuy Nové Guiney prokázaly 62% redukci výskytu parazita⁶⁹. Dalším poměrně nadějným se ukazuje dlouhý syntetický peptid odvozený od MSP-3, obsahující epitopy z B- a T-lymfocytů. První fáze klinických testů byla provedena v Burkina Faso, přičemž byla u dobrovolníků pozorována výrazná tvorba protilátek⁷⁰. Pro přípravu vakcín se dají

využít i protilátky produkované proti antigenům exprimovaným během sexuální fáze parazita – lze je použít na zastavení oplodnění a vývinu do stádia sporozoitů. Mezi takové antigeny patří povrchové antigeny gametocytů parazita: Pfs25, Pfs28, Pfs48/45 a Pfs230 (cit.^{71–73}).

5. Závěr

Výzkum v oblasti patogeneze různých onemocnění neustále přináší nové poznatky, které se stávají základem pro návrh a produkci vakcín v zájmu prevence nebo jako látek působících přímo proti původcům onemocnění. Proces vytvoření nové vakcíny od jejího navržení až po zavedení do klinické praxe je časově a finančně náročný. Důraz je kladen na bezpečnost vakcíny a v neposlední řadě také na její efektivnost a ekonomickou relevantnost. Nejnovějším trendem v oblasti vývoje vakcín je využití virových vektorů. Viry jsou samy o sobě značně imunogenní a protilátky, které se po imunizaci takovou vakcínou produkují, jsou u testovaných zvířat velmi efektivní. Komplikací je, že imunitní odpověď u člověka je často slabá nebo získaná imunita pouze dočasná, často je pozorována též výrazná reaktogenita (lokální bolest a zarudnutí). V současnosti jsou nejžádanějšími vakcínami vakcíny proti HIV, malárii, tuberkulóze, hepatitidě B a C, horečce Dengue a japonské encefalitidě. Zavedení účinné vakcíny do klinického užívání konkrétně u HIV, malárie a tuberkulózy je bohužel zatím v nedohlednu.

Táto práca vznikla za finanční podpory grantu ME 904 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

Seznam použitých zkratk

AVIP	AIDS Vaccine Integrated Project
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> bacillus Calmette-Guérin
CA	kapsidový protein
CD4	diferenční skupina povrchových glykoproteinů
CM	cytoplasmatická membrána
env	envelope, prekursor pro povrchové glykoproteiny
ER	endoplasmatické retikulum
gag	group-specific antigen, strukturní polyprotein
gp120	glykoprotein120
gp41	glykoprotein41
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPV	<i>Human Papillomavirus</i>
IN	integráza
MA	matrixový protein
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NC	nukleokapsidový protein
nef	negative regulatory factor
PIC	preintegrační komplex
pol	polymerasa
rev	regulator of virion
RT	reverzní transkriptasa
SU	povrchová podjednotka

tat	trans-activator of transcription
TM	transmembránová podjednotka

LITERATURA

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>, staženo 21.09.2009.
2. <http://www.who.int/features/qa/71/en/index.html>, staženo 21.09.2009.
3. <http://www.who.int/research/en/>, staženo 14.06.2009.
4. Almond J. W.: Nat. Rev. Microbiol. 5, 481 (2007).
5. http://data.unaids.org/pub/GlobalReport/2008/JC1511_GR08_ExecutiveSummary_en.pdf, staženo 7.08.2009.
6. http://data.unaids.org/pub/Report/2008/who2008globaltbreport_en.pdf, staženo 7.08.2009.
7. http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563697_eng.pdf, staženo 6.10.2010.
8. Poehling K. A., Talbot T. R., Griffin M. R., Craig A. S., Whitney C. G., Zell E., Lexau C. A., Thomas A. R., Harrison L. H., Reingold A. L., Hadler J. L., Farley M. M., Anderson B. J., Schaffner W.: JAMA 295, 1668 (2006).
9. http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_IVB_07.05_eng.pdf, staženo 22.09.2009.
10. Garland S. M., Steben M., Hernandez-Avila M., Koutsky L. A., Wheeler C. M., Perez G., Harper D. M., Leodolte S., Tang G. W. K., Ferris D. G., Esser M. T., Vuocolo S. C., Nelson M., Railkar R., Sattler C., Barr E.: Clin. Vaccine Immunol. 14, 792 (2007).
11. Lewis P. J., Babiuk L. A.: Adv. Virus Res. 54, 129 (1999).
12. Weiner D. B., Kennedy R. C.: Sci. Am. 281, 34 (1999).
13. Daheshia M.: J. Immunol. 159, 1945 (1997).
14. Silva C. L., Lowrie D. B.: Immunology 82, 244 (1994).
15. Lu M., Blacklow S. C., Kim P. S.: Nat. Struct. Biol. 2, 1075 (1995).
16. Markosyan R. M., Cohen F. S., Melikyan G. B.: Mol. Biol. Cell 14, 926 (2003).
17. Chen B., Vogan E. M., Gong H., Skehel J. J., Wiley D. C., Harrison S. C.: Nature 433, 834 (2005).
18. Melikyan G. B., Markosyan R. M., Hemmati H., Delmedico M. K., Lambert D. M., Cohen F. S.: J. Cell Biol. 151, 413 (2000).
19. Vogt V. M., v knize: *Retroviruses* (Coffin J. M., Hughes S. H., Varmus H. E., ed.), kap. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1997.
20. Miller M. D., Farnet C. M., Bushman F. D.: J. Virol. 71, 5382 (1997).
21. Bukrinsky M. I., Sharova N., McDonald T. L., Pushkarskaya T., Tarpley W. G., Stevenson M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6125 (1993).
22. Nermut M. V., Fassati A.: J. Virol. 77, 8196 (2003).
23. Ferrari G., Humphrey W., McElrath M. J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 1396 (1997).

24. Jamison D. T., Feachem R. G., Makgoba M. W., Bos E. R., Baingana F. K., Hofman K. J., Rogo K. O. (ed.): *Disease in Sub-Saharan Africa*. World Bank Oxford University Press, Washington, D.C. 2006.
25. de Bruyn G., Rossini A. J., Chiu Y. L., Holmanc D., Elizaga M. L., Frey S. E., Burke D., Evans T. G., Corey L., Keefer M. C.: *Vaccine* 22, 704 (2004).
26. <http://gateway.nlm.nih.gov/MeetingAbstracts/ma?f=102240264.html>, staženo 30.09.2009.
27. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00001136>, staženo 30.09.2009.
28. Hel Z., Johnson J. M., Tryniszewska E., Tsai W., Harrod R., Fillem J., Tartaglia J., Francini G.: *Vaccine* 20, 3171 (2002).
29. Berman P. W., Huang W., Riddle L., Gray A. M., Wrin T., Vennari J., Johnson A., Klaussen M., Prashad H., Köhne Ch., deWit Ch., Gregory T. J.: *Virology* 265, 1 (1999).
30. <http://gateway.nlm.nih.gov/MeetingAbstracts/ma?f=102230089.html>, staženo 30.09.2009.
31. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00002402>, staženo 30.09.2009.
32. Nabel G. J.: *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 484 (2007).
33. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00384787>, staženo 23.09.2009.
34. Ensoli B.: *Microbs and Infection* 7, 1433 (2005).
35. Johnston H. I., Flores J.: *Curr. Opin. Pharmacol.* 1, 504 (2001).
36. Kaufmann S. H. E.: *Ann. Rheum. Dis.* 61, 54 (2002).
37. Flesch I. E. A., Kaufmann S. H. E.: *Immunobiology* 189, 316 (1993).
38. Buc M.: *Imunológia*, str. 32. VEDA Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava 2001.
39. Kaufmann S. H. E.: *Nat. Rev. Immunol.* 1, 20 (2001).
40. Banchereau J., Steinman R. M.: *Nature* 392, 245 (1998).
41. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/, staženo 08.06.2009.
42. Dye C.: *Lancet* 367, 938 (2006).
43. Andersen P., Doherty T. M.: *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 656 (2005).
44. Horwitz M. A., Harth G.: *Infect. Immun.* 71, 1672 (2003).
45. Belisle J. T., Vissa V. D., Sievert T., Takayama K., Brennan P. J., Besra G. S.: *Science* 276, 1420 (1997).
46. Wiker H. G., Harboe M.: *Microbiol. Rev.* 56, 648 (1992).
47. Rambukkana A., Das P. K., Chand A., Baas J. G., Groothuis D. G., Kolk A. H.: *Scand. J. Immunol.* 33, 763 (1991).
48. Winau F.: *Immunity* 24, 105 (2006).
49. Agger E. M., Rosenkrands I., Olsen A. W., Hatch G., Williams A., Kritsch C., Lingnau K., von Gabain A., Andersen C. S., Korsholm K. S., Andersen P.: *Vaccine* 24, 5452 (2006).
50. Dietrich J., Andersen C., Rappuoli R., Doherty T. M., Jensen Ch. G., Andersen P.: *J. Immunol.* 177, 6353 (2006).
51. Pai M., Riley L.W., Colford J. M. Jr.: *Lancet Infect. Dis.* 4, 761 (2004).
52. Andersen P.: *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 486 (2007).
53. Skeiky Y. A. W., Alderson M. R., Ovendale P. J., Guderian J. A., Brandt L., Dillon D. C., Campos-Neto A., Lobet Y., Dalemans W., Orme I. M., Reed S. G.: *J. Immunol.* 172, 7618 (2004).
54. McShane H., Pathan A. A., Sander C. R., Keating S. M., Gilbert S. C., Huygen K., Fletcher H. A., Hill A. V. S.: *Nat. Med.* 10, 1240 (2004).
55. Andersen P.: *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 486 (2007).
56. Sturm A., Amino R., van de Sand C., Regen T., Retzlaff S., Renneberg A., Krueger A., Pollok J. M., Menard R., Heussler V. T.: *Science* 313, 1287 (2006).
57. Cogswell F. B.: *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 26 (1992).
58. <http://www.cdc.gov/malaria/>, staženo 28.5.2009.
59. Fairley N. H.: *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 40, 621 (1947).
60. Garnham P. C. C., v knize: *Malaria* (Kreier J., ed.), str. 95, sv. 1. Academic Press, Inc., Orlando 1980.
61. Krotoski W. A., Collins W. E., Jumper J. R.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 22, 443 (1973).
62. Shinn S. C., Vanderberg J. P., Terzakis J. A.: *J. Protozool.* 29, 448 (1982).
63. Robson K. J. H., Frevert U., Reckmann I., Cowan G., Beier J., Scragg I. G., Takehara K., Bishop D. H. L., Pradel G., Sinden R., Saccheo S., Muller H. M., Crisanti A.: *EMBO J.* 14, 3883 (1995).
64. Alonso P. L., Sacarlal J., Aponte J. J., Leach A., Macete E., Milman J., Mandomando I., Spiessens B., Guinovart C., Espasa M., Bassat Q., Aide P., Ofori-Anyinam O., Navia M. M., Corachan S., Ceuppens M., Dubois M. C., Demoitié M. A., Dubovsky F., Menéndez C., Tornieporth N., Ballou W. R., Thompson R., Cohen J.: *Lancet* 364, 1411 (2004).
65. Alonso P. L., Sacarlal J., Aponte J. J., Leach A., Macete E., Aide P., Sigauque B., Milman J., Mandomando I., Bassat Q., Guinovart C., Espasa M., Corachan S., Lievens M., Navia M. M., Dubois M. C., Menéndez C., Dubovsky F., Cohen J., Thompson R., Ballou W. R.: *Lancet* 366, 2012 (2005).
66. Webster D. P., Dunachie S., Vuola J. M., Berthoud T., Keating S., Laidlaw S. M., McConkey S. J., Poulton I., Andrews L., Andersen R. F., Bejon P., Butcher G., Sinden R., Skinner M. A., Gilbert S. C., Hill A. V. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 4836 (2005).
67. <http://www.malariavaccine.org/rd-research-programs.php>, staženo 30.09.2009.
68. Stewart V. A., McGrath S. M., Dubois P. M., Pau M. P., Mettens P., Shott J., Cobb M., Burge J. R., Larson D., Ware L. A., Demoitie M. A., Weverling G. J., Bayat B., Custers J. H. H. V., Dubois M. C., Cohen J., Goudsmit J., Heppner D. G., Jr.: *Infect. Immun.* 75, 2283 (2007).
69. Genton B., Al-Yamana F., Betuela I., Anders R. F., Saul A., Baea K., Mellombo M., Taraika J., Browne G. V., Pye D., Irving D. O., Felger I., Beckb H. P.,

- Smith T. A., Alpers M. P.: Vaccine 22, 30 (2003).
71. Li S., Locke E., Bruder J., Clarke D., Doolan D. L., Havenga M. J. E., Hill A. V. S., Liljestrom P., Monath T. P., Naimi H. Y., Ockenhouse Ch., Tang D. C., Van Kampen K. R., Viret J. F., Zavala F., Dubovsky F.: Vaccine 25, 2567 (2007).
72. Thera M. A., Doumbo O. K., Coulibaly D., Diallo D. A., Sagara I., Dicko A., Diemert D. J., Heppner D. G., Jr., Stewart V. A., Angov E., Soisson L., Leach A., Tucker K., Lyke K. E., Plowe CH. V.: PLoS Clin. Trials 1, 34 (2006).
73. Todryk S. M., Hill A. V. S.: Nat. Rev. Microbiol. 5, 489 (2007).

P. Grznárová and J. Lipov (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Advances in Development of Vaccines Against HIV, Tuberculosis and Malaria**

The research in vaccine development is growing very intensively. More than 95 clinical trials of potential HIV vaccines have been performed in last 25 years. Currently, only two HIV vaccine candidates are in Phase III trials and one in Phase II trial. Tuberculosis is another problematic disease of the 21st century. Calmette-Guérin vaccine from *Mycobacterium bovis* bacillus is the only one used for immunization against tuberculosis. Unfortunately, it is effective only in newborns but not in adults; thus, efforts are still put to prepare an effective vaccine for immunization and treatment of adults. Malaria killed more than 1 million people in 2006, most of them were children. We still do not have any vaccine effective in prevention of malaria; nevertheless, some vaccine candidates appeared and are now in Phase I or Phase II trial.



Na adrese <http://www.chemicke-listy.cz/authors/index.html> naleznete nový rejstřík autorů publikujících v našem časopise od roku 1997.

redakce
