

СТРУКТУРА И ИММУНОАДЬЮВАНТНЫЕ СВОЙСТВА CpG-ДНК

Половинкина В.С., Марков Е.Ю.

ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»
Роспотребнадзор, г. Иркутск

Резюме. Бактериальная ДНК (бДНК), наряду с другими бактериальными патоген-ассоциированными молекулярными структурами, способна активировать системы как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Эта активность связана с наличием в молекуле бДНК неметилированных CpG-динуклеотидов и может имитироваться синтетическими CpG олигодезоксинуклеотидами (CpG-ОДН). Неметилированные CpG-ОДН распознаются Toll-подобными рецепторами 9 и инициируют сигнальный каскад реакций, приводящий к синтезу провоспалительных цитокинов иммункомпетентными клетками и активации механизмов иммунологической защиты организма. В обзоре рассматриваются структура, функции, иммуноаdjувантные свойства бДНК и различных классов синтетических неметилированных CpG-ОДН, а также перспективы их клинического применения.

Ключевые слова: бактериальная ДНК, толл-подобные рецепторы, CpG динуклеотиды, адьювант.

Polovinkina V.S., Markov E.Yu.

STRUCTURE AND IMMUNE ADJUVANT PROPERTIES OF CpG-DNA

Abstract. Bacterial DNA, along with other bacterial pathogen-associated molecular structures, may activate both innate and adaptive immune systems. This activity is associated with by nonmethylated CpG dinucleotides, which are present in the bDNA molecule, and it may be simulated by synthetic CpG oligodeoxynucleotides (ODNs). Non-methylated CpG motifs are recognized by Toll-like receptor 9 that triggers the induction of cell signaling pathways, activating proinflammatory cytokine synthesis by immune competent cells, and triggering the immune protection mechanisms. In present review we consider structure, functions, adjuvant features, immune properties and potential clinical applications of bacterial DNA and various classes of synthetic non-methylated CpG-ODNs. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 6, pp 469-476)

Keywords: bacterial DNA, toll-like receptors, CpG dinucleotide, adjuvant effects.

Введение

Попытки стимуляции иммунной системы бактериальными препаратами (лизаты и экстракты бактериальных клеток, вакцина Bacillus Calmette Gurin, BCG) для защиты от бактериальных инфекционных заболеваний и иммунотерапии злокачественных новообразований предпринимались давно и неоднократно [1, 3, 5, 6]. Однако лишь относительно недавно удалось охарактеризовать активные компоненты бак-

териальных лизатов, одним из которых, наряду с другими PAMPs, оказалась бДНК [32, 36]. Несмотря на то, что первоначально нуклеиновые кислоты считались иммунологически инертными, в настоящее время установлено, что бДНК обладают всеми необходимыми для патоген-ассоциированных молекулярных структур (pathogen associate molecular patterns — PAMPs) свойствами, выражающимися в стимуляции врожденного иммунитета и способности формировать защиту от микробных инфекционных агентов у позвоночных животных. В ряде работ был продемонстрирован ярко выраженный иммуностимулирующий эффект от применения препаратов бактериальных ДНК в защите лабораторных животных от заражения патогенными микроорганизмами [2, 4, 8, 13, 15, 16, 19,

Адрес для переписки:

Половинкина Валерия Сергеевна
664047, г. Иркутск, ул. Трилесера, 78.
Тел.: (3952) 22-01-38.
Факс: (3952) 22-01-40.
E-mail: valerisa@list.ru, adm@chumin.irkutsk.ru

22, 27, 33]. Как показали исследования, проведенные за последние три десятилетия, реакция организма хозяина на введение бДНК в первую очередь заключается в активации механизмов врожденного иммунитета, представляющих собой первую «линию обороны» против инфекционных возбудителей, паразитов и трансформированных клеток. Установлено, что бДНК, непосредственно или как костимулирующий сигнал, активирует фактически все клетки иммунной системы, в то время как ДНК позвоночных не обладает такими эффектами [32, 35]. Бактериальная ДНК, в отличие от ДНК позвоночных животных, является стимулятором клеток иммунной системы как при добавлении в культуру клеток, так и при введении лабораторным животным. Несмотря на принципиальное сходство в строении и структуре, бДНК существенно отличается от ДНК позвоночных животных и человека. CpG динуклеотиды в геноме позвоночных встречаются с частотой намного ниже ожидаемой, а также ниже, чем в геноме бактерий. Различается также и характер метилирования CpG динуклеотидов. Иммуностимулирующими свойствами обладает не только бДНК. Как оказалось, экстракты и очищенная ДНК представителей семейства *Drosophilidae* также стимулируют иммунитет позвоночных животных, т.к. в геноме этих насекомых обнаружены неметилированные CpG динуклеотиды. ДНК первичнополостных червей-нематод (тип *Nematoda*), а также моллюсков (тип *Mollusca*), геномная ДНК представителей рода *Trypanosoma* (тип *Euglenozoa*) также содержит CpG динуклеотиды, стимулирующие иммунитет [3, 26, 35].

Идентификация CpG динуклеотида

Для идентификации фрагментов бДНК, обладающих иммуностимулирующей активностью, был предпринят ряд исследований, направленных на изучение ее структуры и свойств. На начальном этапе исследований считали, что иммуностимулирующая активность ДНК зависит от ее определенной вторичной и третичной структуры. Исследования показали, что очищенная ДНК бактерий и синтетические неметилированные поли-(dC, dG)-дезоксинуклеотиды, состоящие из цепочки повторяющихся оснований — цитозинов и гуанинов, активируют пролиферацию В-клеток и натуральных киллеров (NK-клеток) мыши, стимулируют выработку интерферонов. В то время как метили-

рованные поли-(dC, dG)-дезоксинуклеотиды, а также бДНК, обработанная специфической метилазой, не обладали каким-либо стимулирующим эффектом на иммунную систему млекопитающих [32]. Однако, исходя из этих данных, было сделано предположение, что метилирование нарушает уникальную вторичную структуру молекулы бДНК, разрушая так называемые образования типа «стебель-петля», «G-последовательность» или «G-квартет», которые, как считалось, и ответственны за активацию иммунной системы [28, 32, 36]. Дальнейшие исследования показали, что именно неметилированные dC, dG фрагменты бДНК (CpG динуклеотиды), а не сложные вторичные структуры, играют ключевую роль в активации врожденного иммунитета позвоночных. CpG динуклеотиды — это участки ДНК, где нуклеотиды G и C соединены фосфатом в линейную последовательность (дезоксцитидин-фосфат-дезоксигуанозин) при помощи фосфодиэстеразной связи. Считается, что метилирование ДНК в CpG динуклеотиде свойственно в основном эукариотам и заключается в присоединении метильной группы к цитозину в позиции C5 цитозинового кольца при помощи метилтрансферазы с образованием 5-метилцитозина. Стоит отметить, что у позвоночных животных метилировано 70%-80% CpG сайтов. Бактериальная ДНК в CpG сайтах метилированию не подвергается [26, 36]. Многочисленные исследования начала 90-х годов прошлого столетия доказали, что именно неметилированные CpG динуклеотиды бДНК, стимулируют иммунную систему и активируют В- и NK-клетки [35, 36].

Еще одно подтверждение иммуностимулирующей роли неметилированной CpG-ДНК было получено при разработке лекарственных препаратов на основе антисмысловых олигонуклеотидов (АСОДН), способных специфически подавлять экспрессию генов [5, 11]. Лекарственные препараты на основе АСОДН разрабатывают для борьбы с генетически детерминированными и вирусными болезнями. На ранних этапах развития таких технологий некоторые исследователи АСОДН сообщали о неожиданных эффектах, таких как стимуляция пролиферации лимфоцитов, а также активация синтеза иммуноглобулинов. Так АСОДН против *rev* гена ВИЧ, а также некоторые контрольные последовательности, вызывали активную пролиферацию В-клеток и спленоmegалию *in vivo* у мышей. АСОДН против некоторых генов *hsv*

(вируса простого герпеса) также вызывали пролиферацию В-клеток [11, 28]. Синтез и испытание ОДН с различной структурой показали, что пролиферацию В-клеток активируют только те ОДН, в составе которых обнаружены неметилированные CpG динуклеотиды. Открытие и доказательство иммуностимулирующей роли бактериальной ДНК и неметилированных CpG динуклеотидов позволило создать целый ряд синтетических неметилированных аналогов CpG-ДНК – CpG-ОДН, пригодных для иммунотерапии различных инфекционных и онкологических заболеваний [3, 13, 25, 30, 35, 36].

Особенности структуры CpG-ОДН

Установление влияния оснований, фланкирующих CpG динуклеотиды, на иммунную систему позвоночных животных позволило пересмотреть данные об иммуностимулирующем эффекте бДНК и неметилированных синтетических CpG-ОДН. Оказалось, что неметилированные CpG динуклеотиды стимулируют активность иммунной системы, независимо от того, входят ли они в состав геномной бДНК или находятся в форме синтетического ОДН. Однако уровень иммунных стимулирующих эффектов в большой степени зависит от оснований, фланкирующих CpG динуклеотиды. В процессе изучения возможных комбинаций оснований были выявлены оптимальные структуры CpG-ОДН, обладающие максимальной иммуностимулирующей активностью. Так, последовательности, обладающие наибольшим воздействием на иммунную систему, имеют следующую нуклеотидную структуру: XCGY, где X – любое основание, кроме С, и Y – любое основание, кроме G. Наиболее выраженным активирующим воздействием на клетки иммунной системы человека обладают ОДН с последовательностью 5'-GTCGTT-3', в то время как ОДН с последовательностью 5'-GACGTT-3' оптимальны для активации иммунокомпетентных клеток мыши. Интересно, что с увеличением числа повторов неметилированных CpG динуклеотидов в нуклеотидной последовательности усиливается стимулирующая активность ОДН. Как правило, наиболее активные ОДН имеют два или три CpG мотива, а дополнение большего числа компонентов активность не увеличивает. Присоединение же CpG динуклеотида на 5' или 3' концах палиндрома или добавление CpG в неблагоприятном контексте может фактически на порядок снизить иммуностимулирующую способность

CpG-ОДН. ОДН, не имеющие в своем составе CpG динуклеотидов, не обладают иммуногенной активностью [15, 25, 30, 35]. С учетом установленных фактов создан целый ряд синтетических неметилированных CpG-ОДН, отличающихся друг от друга как по составу нуклеотидов, так и спецификой опосредуемых иммуностимулирующих эффектов. На основании этих различий все CpG-ОДН были разделены на 4 основных класса: А, В, С и Р [30, 35].

А-класс – фосфодиэстеразные CpG-ОДН, неустойчивые к воздействию нуклеаз. Как и бДНК, они являются мощными индукторами $IFN\alpha$ и активаторами NK-клеток. Однако их способность стимулировать В-лимфоциты невысока.

В-класс – CpG-ОДН, модифицированные фосфоротиоатные нуклеотидные последовательности. В В-Класс входят CpG-ОДН с гексамерной структурой и основной формулой «пурин-пиримидин-С-G-пиримидин-пиримидин» (например 5'-GTCGTT-3' и 5'-GACGTT-3'). Благодаря модификации представители данного класса CpG-ОДН устойчивы к действию нуклеаз, а их иммуностимулирующая активность в 10-100 раз превышает активность фосфодиэстеразных CpG-ОДН. В исследованиях *in vivo* эти CpG-ОДН демонстрируют длительные стимулирующие эффекты по типу лимфаденопатии. Отмечается также активация В-лимфоцитов и стимуляция секреции TNF и IL-12, индукция созревания плазматоидных дендритных клеток (plasmacytoid dendritic cells – pDC) и моноцитов, но при этом слабо активируются NK-клетки.

С-класс также представлен ОДН с модифицированными фосфоротиоатными нуклеотидными последовательностями, которые сочетают в себе иммуностимулирующие свойства CpG-ОДН А- и В-классов, хотя выражены они немного слабее. Наиболее активный представитель этого класса, М362, состоит из центральной палиндромной последовательности с CG динуклеотидом, характерной для CpG-ОДН А-класса, и «TCGTCG мотивом» на 5' конце, присутствующем в CpG-ОДН В-класса.

Р-класс CpG-ОДН представлен мощными индукторами $IFN\alpha$, хотя, как и представители С-класса CpG-ОДН, они слабо стимулируют активацию В-клеток и pDC [30, 35]. Р-класс состоит из двух палиндромных последовательностей, образующих конкатемеры, мультимерные единицы, где каждая молекула связана посредством Уотсон–Криковского спаривания оснований

со вторым и третьим палиндромом [30]. Позвоночные организмы заметно отличаются от бактерий по составу оснований, фланкирующих CpG динуклеотиды. Как оказалось, эти основания в геномах позвоночных животных не случайны: чаще всего перед CpG динуклеотидом встречается основание С, а после CpG динуклеотида наиболее часто встречается основание G. Как было отмечено выше, такое расположение нуклеотидов, фланкирующих CpG динуклеотид, супрессирует активацию иммунной системы. Именно эта разница в составе генетического материала позволяет макрофагам человека отличить бДНК от собственной ДНК [30, 35].

CpG-ОДН как агонисты TLR9

Первоначально были выдвинуты две концепции, рассматривающие, каким образом бДНК и ее синтетические CpG-содержащие фрагменты, распознаются иммунокомпетентными клетками и проявляют свою активность. Согласно первому предположению, бДНК тем или иным способом поглощалась клеткой, попадала в ядро и гибридизировалась с регуляторными участками ядерной ДНК, в результате чего оказывала влияние на транскрипцию специфических генов. Следующая концепция, получившая экспериментальное подтверждение, основывается на наличии специфических рецепторов, узнающих CpG-ОДН и запускающих дальнейшую передачу сигнала. Таким рецептором оказался Toll-подобный рецептор 9 (англ. Toll-like receptor (TLR9), от немецкого удивительный, странный — Toll), который связывает неметилированные CpG-мотивы бДНК, распознает синтетические неметилированные CpG-ОДН [20, 21]. В целом, наряду с TLR9, было идентифицировано 10 человеческих TLR (у других млекопитающих — 12), функционирующих как одно семейство специфических образ распознающих рецепторов (англ. pattern recognition receptors — PRRs). Ключевую роль TLRs играют в индукции врожденного иммунитета, но опосредованно влияют на все клетки иммунной системы. TLRs распознают консервативные PAMPs, в число которых входит CpG-ДНК. Иммунная система использует эти PAMPs в качестве «сигнала опасности», указывающего на присутствие чужеродного инфекционного агента, активирует в ответ на него соответствующие защитные механизмы [35]. TLRs9 локализуются на мембране везикулярных компартментов клеток. Среди клеток

иммунной системы человека только В-клетки и рDC конститутивно экспрессируют TLR9 [35]. Эти клетки путем эндоцитоза поглощают бДНК, которая далее поступает в эндосомальные компартменты, где связывается с TLR9, образуя сигнальный комплекс. Неметилированные CpG динуклеотиды, входящие в состав бДНК, стимулируют TLR9 и активируют клетку. У В-клеток активация TLR9 приводит к секреции провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, и иммунорегуляторных цитокинов, которые могут ограничивать интенсивность воспалительной реакции, таких как IL-10. Увеличивается чувствительность В-клеток к антигенной стимуляции и активируется их дифференциация в плазматические клетки, секретирующие антитела. У пДК это приводит к секреции интерферона типа 1, который в дальнейшем активирует NK-клетки, моноциты и другие антигенпрезентирующие клетки (antigen-presenting cell — APC). Также CpG-ДНК стимулирует созревание рDC в более эффективные APC, способные активировать Т-клетки. TLR9 рецепторы не экспрессируются на покоем Т-клетках. Следовательно, способность CpG-ДНК усиливать антиген — специфический CD4⁺ и CD8⁺Т-клеточный ответ — является косвенным следствием CpG индукции [9, 10, 12, 17, 20]. TLRs млекопитающих — это класс клеточных трансмембранных рецепторов, состоящих из двух доменов. TLR9 состоит из домена, богатого лейциновыми повторами (leucine-rich repeats — LRRs), локализованного на внутренней поверхности мембраны везикулярных компартментов клетки, а также из цитоплазматического домена, имеющего гомологию с цитоплазматическим TIR-доменом IL-1 (TLR/IL-1 рецептор) [7, 10, 12, 24, 25, 26]. В неактивном состоянии TLR9 находятся в мембране в мономерном состоянии. При активации специфическим лигандом, неметилированной CpG-ДНК, они димеризуются (образуется гомодимер), что приводит к последующей передаче сигнала внутрь клетки. TLR9 рецепторы участвуют в активации MyD88 зависимого сигнального пути, общего для всех членов семейства TLR (кроме TLR3). MyD88 (англ. Myeloid differentiation primary response gene 88) — цитозольный адаптерный белок, имеющий участок специфического связывания с активированными TLR рецепторами, является следующим звеном сигнального пути [7]. Он участвует в передаче сигнала от TLR9 рецепторов на группу сигнальных киназ IRAK (англ. Interleukin-1

Receptor-Associated Kinase) (IRAK1, IRAK4). IRAK4 является важнейшей функциональной киназой своей группы, ее отсутствие или недостаточность приводят к нарушению иммунного ответа на бактериальные инфекции [24, 29]. TRAF6, цитозольный адаптерный белок (англ. TNF receptor-associated factor 6) — следующий компонент этого сигнального пути. TRAF6 является важным звеном нескольких сигнальных путей в клетке, регулирующих воспаление и иммунитет. Далее сигнал от TRAF6, посредством целого ряда протеинкиназ и адаптерных белков, таких как ГТФ-связывающий белок Ras, внеклеточная протеинкиназа ERK (англ. extracellular signal-regulated kinase), N-концевая киназа JNK (англ. c-Jun NH2-terminal kinase), I B-киназный комплекс (IKK, IKK, IKK), киназа TAK1 (англ. Transforming growth factor Activated Kinase 1), а также посредством реакций фосфорилирования и убиквитинизации, поступает сразу на два транскрипционных фактора. Во-первых, сигнал поступает на транскрипционный фактор IRF7 (регулирующий синтез интерферонов; англ. Interferon Regulatory Factor 7), что индуцирует экспрессию интерферонов IFN α и IFN β . Во-вторых, сигнал поступает на транскрипционный ядерный фактор NF- κ B (ядерный фактор «каппа-би»; англ. Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells), что приводит к активации синтеза провоспалительных цитокинов. Таким образом, результатом активации TLR9 рецепторов неметилованной CpG-ДНК является индукция экспрессии провоспалительных цитокинов: интерлейкинов (IL-1, IL-6), TFN α , интерферонов (IFN α , IFN β , IFN γ) и антимикробных факторов. В целом TLR9 рецепторы являются мощными клеточными генными модуляторами, активируют нейтрофилы, pDC, NK-клетки, стимулируют функциональную активность фагоцитов, участвуют в генерации реактивных форм кислорода и активации NO-синтазы [10, 12, 17, 18, 20, 21, 29, 35].

СрG-ДНК как перспективный адъювант

Помимо активации систем врожденного иммунитета СрG-ДНК обладает еще одним свойством, заключающимся в ее способности повышать уровень иммунного ответа (посредством TLR9) даже на низкоиммуногенные антигены. Раскрытие механизмов активации иммунной системы посредством СрG-ДНК и TLR9 рецепторов позволило лучше понять особенности иммуностимулирующего влияния этого имму-

номодулятора. Олигодезоксинуклеотиды, содержащие иммуностимулирующие СрG-мотивы, в настоящее время рассматриваются как новый класс иммуноадъювантов. Адъювантное действие СрG-ДНК заключается в способности опосредованно, через pDC или другие APC, активировать цитокиновую секрецию лимфоцитами T χ 1-типа, а также стимулировать В-клетки, продуцирующие антитела к эпитопам антигенов бактериального и опухолевого происхождения. Основным преимуществом СрG-ДНК как адъюванта является отсутствие выраженной токсичности. Поэтому использование СрG-ОДН в качестве адъюванта было одобрено Глобальным консультативным комитетом по безопасности вакцин (ГККБВ) ВОЗ (URL: http://www.who.int/vaccine_safety/reports/june_2004/ru/, дата обращения: 01.07.2009) [14, 25, 35]. Синтетические СрG-ОДН В-класса и С-класса проявляли наибольшую иммуноадъювантную активность и были включены в состав экспериментальных вакцин [30, 35]. Введение этих адъювантов запускает следующие механизмы, активирующие гуморальную иммунную систему организма:

- перекрестное взаимодействие между TLR9 и В-клеточными рецепторами (BCR), приводящее к стимуляции антигенспецифических В-клеток;
- ингибирование апоптоза, повышение выживаемости В-клеток;
- активация и формирование иммунного ответа организма, т.к. присутствие СрG-ОДН значительно усиливает общую иммуногенность вакцин.

СрG-ДНК активирует секрецию Th-1 тождественных цитокинов и хемокинов, оказывает антиапоптотический эффект на CD4⁺ и CD8⁺Т-клетки. Таким образом, даже в отсутствие CD4⁺Т-хелперов, происходит генерация цитотоксических Т-лимфоцитов. Было установлено, что СрG-ОДН индуцируют более сильный Th-1 иммунный ответ, чем другие вакцинные адъюванты, также прошедшие испытания на мышинных моделях (адъювант Фрейнда, соли алюминия). Однако, сопутствующая активация регуляторных путей, приводящих к противоположным эффектам, таким как индукция регуляторных Т-клеток (Tregs), снижает TLR9-опосредованную активацию иммунной системы. Поэтому для усиления терапевтической эффективности СрG-ДНК, активатора и агониста TLR9, возможно совместное введение антагонистов этих ингибиторных путей [18, 34, 35]. СрG-ОДН выбраны адъювантами для широкого спектра экспериментальных

вакцин, включающих в свой состав белковые и пептидные антигены, живые или убитые вирусы, ДС, полисахаридные конъюгаты. Совместное введение, комплексообразование антигена и CpG-ОДН может оптимизировать индукцию антиген-специфического иммунного ответа [16]. Кроме того, для повышения адъювантной активности CpG-ОДН компоненты вакцины возможно вводить в комплексе с различными носителями: наночастицами, микросферами, липосомами, что способствует активации сильного антиген-специфического иммунного ответа [31]. В частности, показано, что за счет иммобилизации CpG-ОДН на полилактид-когликолидных микросферах удается сократить размер ОДН с минимальных 12 оснований до 5-7 оснований. Адъювантная активность CpG-ОДН может быть повышена за счет конъюгации с субъединицей В холерного токсина [16, 18, 21, 27]. Обнаружен также микобактериальный ДНК-связывающий белок 1 (MDP 1), который значительно усиливает CpG-опосредованный иммунный ответ и может быть использован как адъювант для CpG-ДНК-опосредованной иммунотерапии [23]. В экспериментах на животных моделях было доказано, что адъювантная эффективность CpG-ОДН сохранялась при различных способах введения препарата (подкожно, внутримышечно, интраназально, орально, конъюнктивально). Пути активации иммунной системы CpG-ОДН говорят о возможности использования агонистов TLR9 в качестве эффективных адъювантов при конструировании вакцин для профилактики вирусных и бактериальных инфекций [27]. Действительно, в опытах на лабораторных животных было показано, что CpG-ОДН обладают ярко выраженным адъювантным эффектом в смеси с субъединичными вакцинами против ряда инфекций, включая бруцеллез, чуму и туляремию [8, 18, 19].

CpG-ОДН В-класса проходят клинические испытания в качестве адъювантов к поверхностному антигену гепатита В. Рандомизированные, двойные слепые, плацебо-контролируемые клинические исследования I/II фазы, с привлечением здоровых добровольцев показали, что благодаря включению CpG-ОДН иммуногенный эффект, а также степень выраженности и скорость формирования антиген-специфического иммунного ответа увеличились [13, 35]. Данный подход может быть перспективным против потенциальных биотеррористических агентов, таких как сибирская язва, в том случае, где вакцинация и быстрое формирование иммунного

ответа становятся необходимыми. Так, при использовании CpG-ОДН вместе с вакциной против сибирской язвы AVA (англ. Anthrax Vaccine Adsorbed) в рандомизированных, двойных слепых, плацебо-контролируемых клинических исследованиях, с привлечением здоровых добровольцев, наблюдалась ускоренная сероконверсия. У субъектов, получавших в качестве контроля вакцину без адъюванта, титр антител (Ат) достигал пика на 48 день после инъекции, а у получавших адъювант CpG-ОДН максимальный титр Ат был достигнут уже на 22 сутки. Кроме того, добавление CpG адъюванта индуцировало статистически значимое увеличение титра Ат к *B. anthracis* почти в 9 раз, а также увеличило долю субъектов, которые достигли сильного IgG иммунного ответа к сибиреязвенному протективному антигену с 61% до 100% [35]. CpG ODN также является перспективным адъювантом для противоопухолевых вакцин [3, 27, 28, 36, 37]. Дальнейшие перспективные направления исследований CpG-вакцин связаны с поиском новых эффективных ОДН разных классов, изучением механизмов их воздействия на различные звенья иммунитета, а также разработкой вопросов их клинического применения.

Заключение

Благодаря успехам, достигнутым в молекулярной биологии, иммунологии, биотехнологии и генной инженерии, по мере накопления знаний о механизмах иммунитета, перед исследователями открылись новые перспективы по созданию и усовершенствованию вакцин и адъювантных препаратов против широкого круга патогенов. За последнее десятилетие было разработано и клинически оценено большое число адъювантов, повышающих иммуностимулирующие свойства вакцин. Их использование в терапии инфекционных и опухолевых заболеваний стало во многом стандартной процедурой [1, 6, 16, 27, 33, 37]. Благодаря целому спектру иммуностимулирующих свойств бДНК и CpG-ОДН являются перспективными адъювантами. Адъювантное влияние бДНК и CpG-ОДН объясняется их способностью значительно повышать уровень иммунного ответа даже на антигены с низкой иммуногенностью. CpG-ОДН стимулируют клетки, экспрессирующие TLR9, инициируя тем самым иммуномодуляторный каскад реакций, кульминацией которого является выработка Th1- и провоспалительных цитокинов и хемокинов. CpG-ОДН также улучшают

антигенпрезентирующие функции ДК, моноцитов и макрофагов, индуцируют пролиферацию В-клеток, стимулируют иммунопротективную активность НК-клеток и привлекают Т-клетки к месту введения ОДН. Эти разнообразные виды воздействия CpG-ОДН на иммунную систему организма хозяина обуславливают их значение как адъювантов вакцин. Однако в первую очередь реакция организма на CpG-ДНК заключается в активации различных неспецифических механизмов иммунологической защиты, представляющих собой первую линию обороны против возбудителей инфекций и трансформированных клеток. Доклинические исследования на животных моделях и проводящиеся в настоящее время клинические испытания I, II и III фаз показали, что CpG-ДНК и синтетические CpG-ОДН, как активаторы TLR9 рецепторов, являются эффективными и безопасными адъювантами для широкого спектра вакцин и важным триггером протективного иммунного ответа против многих патогенов.

Список литературы

1. Козлов И.Г., Тимаков М.А. Иммуноterapia: вчера, сегодня, завтра // Педиатрия. — 2009. — Т. 87, № 4. — С. 140-149.
2. Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Загоскина Т.Ю., Половинкина В.С., Иванова Т.А., Саппо С.Г., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Голубинский Е.П. Протективная активность субклеточных фракций *Yersinia pestis* при экспериментальной чуме у белых мышей // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. — 2004. — Т. 2, № 1. — С. 123-127.
3. Олишевский С.В., Козак В.В., Мазур О.В., Шляховенко В.А. Применение CpG ДНК *Bacillus subtilis* в экспериментальной иммунотерапии опухолей // Российский биотерапевтический журнал. — 2007. — Т. 6, № 3. — С. 19-29.
4. Половинкина В.С., Иванова Т.А., Николаев В.Б., Марков Е.Ю. Получение микрокорпускулярного антигенного комплекса, способного формировать напряженный иммунитет против чумы на фоне экстренной неспецифической профилактики // Журнал инфекционной патологии. — 2009. — Т. 16, № 3. — С. 178-179.
5. Рыкова Е.Ю., Лактионов П.П., Власов В.В. Активирующее влияние ДНК на иммунную систему // Успехи современной биологии. — 2001. — Т. 121, № 2. — С. 160-171.
6. Серебряная Н.Б., Новик А.А. ДНК как иммуностимулятор // Медицинская иммунология. — 2001. — Т. 3, № 1. — С. 27-34.
7. Akira S., Hoshino K. Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling // J. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 187, N 2. — P. 356-363.
8. Amemiya K., Meyers J.L., Rogers T.E., Fast R.L., Bassett A.D., Worsham P.L., Powell B.S., Norris S.L., Krieg A.M., Adamovics J.J. CpG oligodeoxynucleotides augment the murine immune response to the *Yersinia pestis* F1-V vaccine in bubonic and pneumonic models of plague // Vaccine. — 2009. — Vol. 27, N 16. — P. 2220-2229.
9. Barton G. M., Kagan J. C. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization // Nature Reviews. Immunology. — 2009. — Vol. 9. — P. 535-542.
10. Beutler B.A. TLRs and innate immunity // Blood. — 2009. — Vol. 113. — P. 1399-1407.
11. Branda R.F., Moore A.L., Mathews L., McCormack J.J., Zon G. Immune stimulation by an antisense oligomer complementary to the rev gene of HIV-1 // Biochem. Pharmacol. — 1993. — Vol. 45, N 10. — P. 2037-2043.
12. Chuang T., Ulevitch R.J. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9 // Eur. Cytokine Netw. — 2000. — Vol. 11. — P. 372-378.
13. Cooper C.L., Davis H.L., Angel J.B., Morris M.L., Elfer S.M., Seguin I., Krieg A.M., Cameron D.W. CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults // AIDS. — 2005. — Vol. 19, N 14. — P. 1473-1479.
14. De Francesco R., Migliaccio G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C // Nature. — 2005. — Vol. 436, N 18. — P. 953-960.
15. Elkins K.L., Rhinehart-Jones T.R., Stibitz S., Conover J.S., Klinman D.M. Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria // J. Immunol. — 1999. — Vol. 162, N 4. — P. 2291-2298.
16. Heit A., Schmitz F., O'Keeffe M., Staib C., Busch D.H., Wagner H., Huster K.M. Protective CD8 T cell immunity triggered by CpG-protein conjugates competes with the efficacy of live vaccines // J. Immunol. — 2005. — Vol. 174, N 7. — P. 4373-4380.
17. Jin M.S., Lee J.O. Structures of the Toll-like receptor family and its ligand complexes // Immunity. — 2008. — Vol. 29. — P. 182-191.

18. Jurk M., Vollmer J. Therapeutic applications of synthetic CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists for immune modulation // *BioDrugs*. – 2007. – Vol. 21, N 6. – P. 387-401.
19. Kaushik P., Singh D.K., Kumar S.V., Tiwari A.K., Shukla G., Dayal S., Chaudhuri P. Protection of mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with recombinant OMP28 adjuvanted with CpG oligonucleotides // *Vet. Res. Commun.* – 2010. – Vol. 34, N 2. – P. 119-132.
20. Kawai T., Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition // *Int. Immunol.* – 2009. – Vol. 21, N 4. – P. 317-337.
21. Kumar H., Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and innate immunity // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2009. – Vol. 388. – P. 621-625.
22. Markov E.Yu., Nikolaev V.B., Ivanova T.A., Golubinsky E.P., Innokenteva T.I., Dubrovina V.I., Polovinkina V.S., Popova Yu.O., Vitjazeva O.I., Kozlov S.N. Protective activity of *Yersinia pestis* EV antigenic complex with the immunostimulators and combined use of doxycycline // *Scientific Journal of Center for Infectious Diseases with Natural Foci*. – 2005. – P. 176-184.
23. Matsumoto S., Matsumoto M., Umemori K., Ozeki Y., Furugen M., Tatsuo T., Hirayama Y., Yamamoto S., Yamada T., Kobayashi K. DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 175, N 1. – P. 441-449.
24. Medvedev A.E., Lentschat A., Kuhns D.B. Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections // *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 798. – P. 521-531.
25. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response // *Nature*. – 2007. – Vol. 449. – P. 819-826.
26. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity // *Nature*. – 1997. – Vol. 333. – P. 394-397.
27. O'Neill L.A., Bryant C.E., Doyle S.L. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer // *Pharmacol. Rev.* – 2009. – Vol. 61, N 2. – P. 177-197.
28. Pisetsky D.S., Reich C.F. The influence of base sequence on the immunological properties of defined oligonucleotides // *Immunopharmacology*. – 1998. – Vol. 40, N 3. – P. 199-208.
29. Ringwood L., Li L. The involvement of the interleukin-1 receptor-associated kinases (IRAKs) in cellular signaling networks controlling inflammation // *Cytokine*. – 2008. – Vol. 42, N 1. – P. 1-7.
30. Samulowicz U., Weber M., Weeratna R., Uhlmann E., Noll B., Krieg A.M., Vollmer J.A. Novel Class of Immune-Stimulatory CpG Oligodeoxynucleotides Unifies High Potency in Type I Interferon Induction with Preferred Structural Properties // *Oligonucleotides*. – 2010. – Vol. 20, N 2. – P. 93-101.
31. Taghavi A., Allan B., Mutwiri G., Foldvari M., Van Kessel A., Willson P., Babiuk L., Potter A., Gomis S. Enhancement of immunoprotective effect of CpG-ODN by formulation with polyphosphazenes against *E. coli* septicemia in neonatal chickens // *Curr. Drug Deliv.* – 2009. – Vol. 6, N 1. – P. 76-82.
32. Tokunaga T., Yamamoto S., Namba K. A synthetic single-stranded DNA, poly (dG,dC), induces interferon- α and β , augments natural killer activity, and suppresses tumor growth // *Jpn. J. Cancer Res.* – 1988. – Vol. 79, N 6. – P. 682-686.
33. Uddowla S., Freytag L.C., Clements J.D. Effect of adjuvants and route of immunizations on the immune response to recombinant plague antigens // *Vaccine*. – 2007. – Vol. 25, N 47. – P. 7984-7993.
34. van Maren W.W., Jacobs J.F., de Vries I.J., Nierkens S., Adema G.J. Toll-like receptor signalling on Tregs: to suppress or not to suppress? // *Immunology*. – 2008. – Vol. 124, N 4. – P. 445-452.
35. Vollmer J., Krieg A.M. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2009. – Vol. 61. – P. 195-204.
36. Yamamoto S., Yamamoto T., Shimada S., Kuramoto E., Yano O., Kataoka T., Tokunaga T. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth // *Microbiol. Immunol.* – 1992. – Vol. 36, N 9. – P. 983-997.
37. Yu P. Nucleic acid recognizing Toll-like receptors as therapeutic targets: a focus on autoimmunity and cancer // *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*. – 2009. – Vol. 2. – P. 19-28.

поступила в редакцию 22.09.2010
принята к печати 02.10.2010