



Review

Stare i nowe sposoby leczenia chorób zakaźnych: wirusy wszędzie i nigdzie

Old and New Prescriptions for Infectious Diseases and the Newest Recipes for Biomedical Products in Plants

HILARY KOPROWSKI

Biotechnology Foundation Laboratories at Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA

Abstract. The three antiviral vaccines discovered in the 18th century (smallpox), 19th century (rabies), and 20th century (polio) share a common feature: none would ever be licensed today for human vaccination. Yet Jenner's smallpox vaccine led to the eradication of smallpox, Pasteur's rabies vaccine represented the first successful post-exposure treatment of people bitten by rabid animals, and polio vaccine administered since its discovery in 1950 is leading to the eradication of polio (in the years 2004–2005) from the earth. However, in the case of rabies, efforts at complete eradication are unrealistic, despite the availability of a very effective vaccine, since rabies, unlike smallpox and polio, is not limited to humans and can infect all domestic and wild mammalian species. Rabies is probably the oldest known infectious disease, yet knowledge of the virus and the disease is far from complete. For instance, the appearance of 24 cases of "cryptic" rabies in the USA, i.e. cases not associated with any bite or scratch, with an incubation period in humans extending 6–8 years, is a puzzling phenomenon that cannot be readily explained. On the other hand, rabies is one of the few strictly neuronal infections and, as such, is an excellent model for the study of neurotropic virus distribution in the brain. Apoptosis induced by a rabies strain expressing high levels of glycoprotein spreads much more slowly through brain tissue than that induced by strains producing lower glycoprotein levels. Attenuated rabies virus constructed to express twice the normal glycoprotein levels is also an excellent antigen for induction of immune responses in the host. Foreign antigens using this vector may also produce highly immunogenic vaccines.

Global approach to immunization. Those monitoring the spread of AIDS in many parts of the world know that cost of treatment is one of the major problems in combating the disease. Vaccines against HIV face the same problem. In general, the price of vaccines and sera is exorbitant for the afflicted population in developing countries. In addition, the dearth of syringes, the unavailability of nurses and doctors to administer multiple vaccine injections, and other factors in these countries require a drastic change in current vaccine production approaches. About 12 years ago, plants became vehicles to produce biomedical reagents. Plants can be exposed directly to a construct containing a foreign gene and *Agrobacterium* to create a transgenic plant that, over several generations, produces the desired product. Alternatively, plants infected with a plant virus (e.g. alfalfa mosaic virus) fused with a foreign gene can propagate the foreign antigen as the virus multiplies. Extraction of the plant virus followed by purification provides the desired biomedical product. Our use of either of these systems has led to the creation of plants producing vaccines, sera, hormones, and other biological reagents. In two clinical trials at the Institute of Bioorganic Chemistry of the Polish Academy of Sciences in Poznań (Poland), volunteers who ingested lettuce expressing hepatitis B vaccine showed hepatitis B antibodies in their sera. In another trial carried out at the Biotechnology Foundation Laboratories in Philadelphia (USA), volunteers ingesting a spinach-

-rabies vaccine showed an immunological priming effect, since only one injection of commercially available rabies vaccine significantly raised the level of rabies-specific antibodies. Vaccines against HIV gp120 and Tat have been produced in spinach, and a construct of gp120 with the CD4 receptor is now being adapted to this plant. Two types of antibodies against rabies and against colorectal cancer are being produced in tobacco and in lettuce. The suboptimal quality of the currently available anthrax vaccine prompted our efforts to produce the anthrax protective antigen (PA) in tobacco and lettuce. Quite clearly, plants will play a prominent role in producing a variety of biomedical reagents in the future.

Key words: vaccines; viruses; infectious diseases; bioproducts in plants.

W XVIII wieku Jenner zaszczerpił żywego wirusa krowianki na skórze człowieka, stwarzając w ten sposób szczepionkę przeciwko ospie. Sto lat później Pasteur użył żywego osłabionego wirusa wścieklizny, tzw. wirusa *fixe*, do immunizacji ludzi. W XX wieku, w 1950 roku, został podany doustnie dziecku żywy, osłabiony wirus polio w zawieszynie mózgu szczura bawełnianego. Doprowadziło to do powstania żywej, doustnej szczepionki przeciwko paraliżowi dziecięcemu (polio).

W historii tych trzech szczepionek można odnaleźć wspólną cechę: w obecnych czasach żadna z nich nie zostałaby dopuszczona przez „autorytety” rządowe do szczepienia człowieka. A jednak ospa została wykorzeniona z powierzchni naszego globu, a paraliż dziecięcy zostanie wyeliminowany w przeciągu 2–3 lat. Pewne jest również, że obecnie stalibyśmy w obliczu epidemii zarówno ospy, jak i polio, gdyby biurokracja zdołała opóźnić podanie odpowiednich szczepionek w skali kraju lub kontynentu. Jak bowiem twierdził Edmond Morgan w swym artykule w „New York Review of Books”: „When science makes prevention (of a disease), obstacles can grow like dragon’s teeth”. W 1889 roku w Europie i Stanach Zjednoczonych istniało więcej niż 100 towarzystw przeciwnych stosowaniu szczepionek. Członkowie tych stowarzyszeń nie wierzyli w skuteczność szczepienia przeciwko ospie i uważali, że naruszało ono ich prawa cywilne. Chociaż odkrycie Jennera datuje się na 1790 rok, to przy końcu I wojny światowej, w 1918 roku, ospa występowała endemicznie w 87 krajach!

Problemy związane z wynalezieniem szczepionki przeciwko polio doprowadziły do tzw. wojny polio, kiedy to prowadzono batalie o pierwszeństwo w opracowaniu szczepionki. W dodatku publiczne zaufanie do szczepionki musiało zostać odzyskane z powodu tragicznego „przypadku Cuttera”, kiedy dzieci w stanie Idaho zachorowały na polio, ponieważ w użytej szczepionce wirus, uważany za zabity, pozostawał w rzeczywistości wirulentny.

Wszystko to już jednak historia. Nie ma już ospy,

a paraliż dziecięcy jest skutecznie eliminowany. Jednakże całkowite wykorzenienie wścieklizny jest, jak mawiają Niemcy, „eine andere Sache”. W przeciwieństwie do ospy i polio, które są ograniczone jedynie do ludzkiego gospodarza, w infekcji wścieklizną gospodarzami są zarówno ludzie, jak i udomowione i dzikie zwierzęta. Ta różnorodność gospodarzy stwarza problem eradykacji wścieklizny pod dużym znakiem zapytania.

Od niepamiętnych czasów zakażenie wścieklizną było zawsze kojarzone z ugryzieniem lub skaleczeniem skóry lub śluzówki. Tytuł napisanej w XVI wieku przez Fracastoro pierwszej „nowoczesnej” rozprawy dotyczącej wścieklizny brzmiał: „Nieuleczalna rana”. Obecnie w Stanach Zjednoczonych zaobserwowaliśmy 24 przypadki wścieklizny u ludzi, u których nie doszło do ugryzienia lub zranienia. Określono je jako „utajona wścieklizna”. Jedyny dostępny trop to wspólne zamieszkiwanie ofiary wścieklizny i nietoperza. W większości przypadków jest to nietoperz srebrnowłosa (silver-haired bat), jeden z najbardziej znanych roznosicieli wścieklizny w Stanach Zjednoczonych. Do niedawna można było uważać szczepionkę przeciwko wściekliznie za produkt conceptualnie podobny do oryginalnej szczepionki Pasteura, z jednym wszakże wyjątkiem: Pasteurowski zabity wirus (wirus *fixe*) nie był tak całkowicie nieszkodliwy dla ludzi jak sądzono. Prawie 100 lat po odkryciu Pasteura, w 1967 roku miało miejsce tragiczne wydarzenie w Fortaleza w Brazylii: na wściekliznę zachorowały dzieci szczepione żywym wirusem *fixe*. Jednak szczepionka opracowana przez Pasteura jest doskonałym produktem i mimo upływu 120 lat od jej odkrycia ciągle zabezpiecza przed licznymi wariantami wścieklizny, odkrytymi niedawno dzięki molekularnym i genetycznym badaniom.

Wścieklizna jest najstarszą znaną na świecie infekcją, jako że była opisywana prawdopodobnie w XXX wieku p.n.e., a niewątpliwie w XXIII stuleciu przed Chrystusem. Jednakże, mimo iż ludzkość przez wieki

obcowała z wścieklizną, do dzisiaj infekcja stanowi zagadkę, czekającą ciągle na pełne rozwiązanie.

Jedno z pytań dotyczy związku pomiędzy nietoperzem a ofiarą wścieklizny, skoro nie ma uszkodzeń skóry przypisywanym ugryzieniu nietoperza. Zakładając, że nie doszło do kontaktu między śliną nietoperza a skórą ofiary, jaki jest los „wstrzykniętego” wirusa? Gdzie następuje jego replikacja? W elementach komórkowych skóry? Nie ma żadnych dowodów, że wirus może skutecznie zainfekować komórki inne niż neurony. Rozwikłanie tajemnicy, która rozgrywa się w organizmie gospodarza, jest trudne z powodu braku odpowiedniego modelu do rekonstrukcji warunków *in vivo*.

Do niedawna (jeszcze 4 wieki temu), czas pomiędzy ugryzieniem i śmiercią z powodu wścieklizny był oceniany na 2 tygodnie do 4 miesięcy (Fracastoro). Obecnie otrzymujemy doniesienia o śmierci wskutek wścieklizny następującej aż 6–8 lat po ugryzieniu. Jakie organy, tkanki lub komórki przechowują wirus tak długo? To następna zagadka związana z wścieklizną!

Zanotowano na świecie jedynie 3 przypadki osób z potwierdzoną diagnozą wścieklizny, które wyzdrowiały. Prawie zawsze regułą jest śmiertelny wynik infekcji. Wścieklizna infekuje jedynie neurony, ale podczas autopsji okazuje się, że neurony nie są niszczone. Jakie sygnały są przekazywane organizmowi przez wirus wścieklizny podczas infekcji, że doprowadza to do takiego spustoszenia? Pomimo olbrzymiego postępu naszej wiedzy o patogenecie wścieklizny, ciągle pozostaje bez odpowiedzi pytanie, dlaczego pacjenci chorzy na wściekliznę prawie zawsze umierają?

Dużo się nauczyliśmy prowadząc badania nad wścieklizną. Mój kolega Bernard Dietzchold zaobserwował, że szczepy wirusów wykazujące wysoki poziom ekspresji glikoproteiny indukują apoptozę w komórkach ośrodkowego układu nerwowego i rozprzestrzeniają się w mózgu znacznie wolniej niż szczepy wykazujące niewielki poziom ekspresji glikoproteiny, nieindukujące apoptozy. Szczepy „apoptotyczne” wywołują również znacznie bardziej intensywną odpowiedź immunologiczną. Opierając się na tej obserwacji Dietzchold stworzył konstrukt, w którym wysoce atenuowane, awirulentne szczepy wścieklizny połączone z dwoma indukującymi apoptozę glikoproteinami innych szczepów. Powstała w ten sposób silnie immunogenna cząsteczka, której użyto jako nośnik materiału pochodzącego z innych biologicznych struktur. Okazało się, że wywołuje ona silną odpowiedź immunologiczną przeciw obcemu antygenowi. Czy znajdzie się ochotnik, który chciałby wypróbować ten konstrukt przeciwko AIDS?

Wirusy wszędzie i nigdzie

Kiedy wiele lat temu mieszkałem w Brazylii, uważałem, iż pierwszą diagnozą stawianą przez lekarza pacjentowi z objawami infekcji był syfilis lub gruźlica, lub też „wiroza”. To ostatnie określenie oznaczało każdą możliwą infekcję wirusową. Nawet dziś jeszcze wiele trywialnych i bardziej poważnych chorób ludzi i zwierząt jest przypisywanych zakażeniu wirusem, oczywiście bez żadnego dalszego dowodu. Nigdy nie oglądałem wirusów powodujących stwardnienie rozsiane (sclerosis multiplex – SM). Prawdopodobnie daremną pracą jest kontynuowanie poszukiwań czynnika wirusowego w chronicznych przypadkach SM, gdyż jeśli w etiologię choroby wpłątany jest wirus lub wiele wirusów, to ich pośrednia aktywność mogła wystąpić we wczesnym okresie życia przyszłych pacjentów z SM.

Poszukiwanie śladów wirusa w przypadkach w pełni rozwiniętych chorób nie dałoby żadnych wyników.

Równie trudne może być znalezienie całkowicie skutecznego lekarstwa na stwardnienie rozsiane, chociaż powolny przebieg choroby może umożliwić znalezienie sposobów zahamowania progresywnego rozwoju uszkodzeń.

Wiele lat temu, podczas badań nad mózgiem z SM, odkryliśmy w obszarach uszkodzeń (plaque) i wokół nich nitrotyrozinę. Nitrotyrozyna jest produktem nadazotanu (peroxynitrite), jednej z najbardziej uszkadzających substancji w organizmie. Funkcję „wymiatacza” nadazotanu pełni kwas moczowy. Z kolei chorobą związaną z hiperuricemią jest podagra. Prześledziliśmy komputerowy rejestr wszystkich chorób w Stanach Zjednoczonych, żeby znaleźć liczbę przypadków SM i porównać je z liczbą pacjentów chorych na podagrę. Stwierdziliśmy, że prawie u żadnego pacjenta z podagrą nie rozwinęło się stwardnienie rozsiane. Dokładniej zbadaliśmy to w przypadku bliźniąt identycznej płci, z których jedno chorowało na SM. Okazało się, że zdrowy męski bliźniak wykazuje znacznie wyższe stężenie kwasu moczowego we krwi niż jego brat z SM. U kobiet, u których stężenie kwasu moczowego jest mniejsze niż u mężczyzn, różnica między bliźniaczką z SM i zdrową siostrą jest mniejsza niż u mężczyzn. To odkrycie wskazuje, że w przypadku kobiet, u których stężenie kwasu moczowego wynosi 5 mg/dl lub mniej, istnieje znacznie większe ryzyko zachorowania na SM niż u mężczyzn. Poczyniwszy te obserwacje u ludzi zajęliśmy się modelami eksperymentalnymi. Jednym z dostępnych modeli jest eksperymentalne alergiczne zapalenie mózgu (*experimental allergic encephalitis* – EAE) u myszy. Podanie kwasu inozynowego, który w organizmie ulega natychmiastowej prze-

mianie do kwasu moczowego, zdecydowanie działa leczniczo na myszy z EAE, które wykazywały objawy choroby. Podanie kwasu moczowego przed iniekcją zasadowego białka mielinowego, wywołującego EAE, całkowicie zapobiega akumulacji nitrotyrozyny w rdzeniu kręgowym.

Oprócz „wymiatania” nadazotanu, kwas moczowy pełni również funkcję w zamykaniu bariery mózg-krew. Nasilenie symptomów w EAE jest bezpośrednio związane ze stopniem przepuszczalności bariery krew-mózg, a kwas moczowy barierę tę uszczelnia.

W pierwszej próbie klinicznej z zastosowaniem inozyiny u chorych z chronicznym SM były dwa przypadki, w których bariera mózg-krew była naruszona. Spożywanie inozyiny przez 10–15 miesięcy spowodowało ustąpienie typowych dla SM uszkodzeń w mózgu, co przedstawiały obrazy uzyskane techniką rezonansu magnetycznego. Obecnie prowadzona jest przez University of Pennsylvania próba kliniczna na większą skalę z podawaniem inozyiny.

Na tym zakończę to interludium i powrócę do głównego tematu mojego wykładu – szczepień w skali globalnej.

Perspektywy

Z całym szacunkiem dla badaczy, którzy ciężko pracują nad wynalezieniem szczepionki przeciwko HIV, chciałbym powiedzieć, że jeśli w końcu odniosą oni sukces i wynajdą szczepionkę, która będzie musiała być podawana w serii 3 lub 4 iniekcji, można z góry powiedzieć, że to jest klęska, zwłaszcza w krajach, gdzie byłaby najbardziej potrzebna.

Kiedy odwiedzałem Instytut Pasteura w Afryce, niezmiennie znajdowałem czekających w kolejce na szczepienie ludzi, którzy zostali ugryzieni przez wściekle zwierzę. W tamtych czasach leczenie polegało na 14–21 zastrzykach szczepionki Pasteura. Lekarz, który dokonywał szczepień, powiedział mi, że jeśli np. do pierwszego zastrzyku ustawiało się w kolejce 30 pacjentów, to drugi otrzymywało 10, a na trzeci do piątego przychodził co trzeci pacjent. Chociaż ludność wiedziała o niebezpieczeństwie, które niesie wścieklizna i o śmiertelności choroby, to poszczególni ludzie nie byli w stanie poddać się leczeniu wymagającemu wielokrotnych wizyt. Ominięcie tej przeszkody okazuje się jednak całkiem proste. W 1957 roku w Kongu Belgijskim 250 000 dzieci i młodzieży zostało zaszczepionych opracowaną przeze mnie w 1950 roku doustną szczepionką przeciwko polio. Szczepionkę „wtryskiwano” do ust osób szczepionych, a cała kampania trwała 6 tygodni. Strategia ta doprowadziła do ogólnoswiatowego wykorzenienia polio.

Drugim problemem, który napotkaliśmy – oprócz znalezienia metod dostarczania produktów biologicznych – jest koszt szczepionek. Czterdzieści lat temu opracowaliśmy szczepionkę przeciwko wściekliznie, hodowaną w kulturach tkankowych, co stanowiło radykalną zmianę w stosunku do cieszącej się przez lata popularnością szczepionki Pasteura. Ponieważ nasza szczepionka wymagała podania tylko 3–4 dawek w bardzo bezpiecznym nośniku, zamiast 14–21 zastrzyków (w przypadku szczepionki Pasteura). W owym czasie myśleliśmy, że niski koszt wytwarzania tej szczepionki znacząco zredukuje cenę produktu finalnego. Jakiż był wynik naszych pobożnych życzeń? Szczepionkę wyceniono na 90 \$ za dawkę, z możliwością obniżenia do 50–60 \$ w krajach rozwijających się. Co należałoby więc uczynić, by radykalnie zmienić stosunek między ceną szczepionek w krajach rozwijających się a średnim rocznym dochodem ich obywateli?

Jedenaście lat temu zacząłem prowadzić badania nad użyciem roślin jadalnych jako nośników doustnych szczepionek. Istnieją dwa sposoby wykorzystania roślin do wytwarzania szczepionek. Pierwszy to użycie roślin transgenicznych, wykazujących ekspresję „obcego” genu, wprowadzonego do liści albo mechanicznie za pomocą pistoletu podobnego do używanego do szczepienia ludzi, albo przez infekcję *Agrobacterium* z wbudowanym „obcym” genem. Bakteria namnaża się i rozprzestrzenia w roślinie, a „obcy” gen zostaje włączony do genomu rośliny i jest dziedziczony przez nasiona. Szczepionkę stanowią oczyszczone ekstrakty z zainfekowanych liści. Drugi sposób polega na zainfekowaniu rośliny „obcym genem”, będącym częścią konstruktów złożonych z wirusa roślinnego, np. wirusa mozaiki tytoniowej lub wirusa *alfalfamosaic*, i obcego genu. Następnie z liści rośliny zainfekowanej izoluje się roślinnego wirusa i oczyszcza antygen. Stosujemy obydwa systemy; skrótowo opiszę rezultaty przeprowadzonych badań przez naukowców w Polsce, w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. W dwóch oddzielnych próbach klinicznych ochotnicy byli karmieni transgeniczną sałatą, wytwarzającą szczepionkę przeciwko *hepatitis B*. U osób z obu grup wystąpiła odpowiedź – przeciwciała przeciw *hepatitis B*. Ponieważ zastosowanie żywych roślin do celów szczepienia stwarza trudności wytwórcy, obecnie jest przeprowadzana trzecia próba, w której podaje się kapsułki zawierające mrożone lub wysuszone, sproszkowane liście transgenicznej sałaty. Proszek nie traci swych antygenowych właściwości. Jednocześnie z grupą ochotników przyjmujących kapsułki, badana jest grupa spożywająca transgeniczne rośliny.

W kolejnym doświadczeniu wyhodowaliśmy szpi-

nak zainfekowany wirusem wścieklizny w połączeniu z wirusem *alfalfamosaic*. Immunizowanie myszy tym konstruktem uodporniło je na wirusa wirulentnego. Ochotnicy karmieni szpinakiem otrzymywali, w celu wywołania odpowiedzi immunologicznej, zwiększoną dawkę komercyjnej szczepionki w postaci nieimmunogennej. Wyniki obu prób – na zwierzętach i z grupą ludzi – sugerują, że konsumenci sałaty lub szpinaku mogą być z powodzeniem immunizowani. Nie ma dowodów, że tolerancja na produkty pokarmowe – jeśli istnieje – w jakikolwiek sposób uniemożliwia odpowiedź immunologiczną na szczepionkę podaną w roślinach.

Użyliśmy również wirusa *alfalfamosaic* do wprowadzenia antygeny „Tat” wirusa HIV do szpinaku. Immunizacja myszy wirusowym ekstraktem spowodowała wytwarzanie przeciwciał anti-Tat. Trwają prace nad wprowadzeniem do roślin białka gp120 i receptora CD4. Wyniki badań wirusa HIV wskazują także, że jedna roślina może wytwarzać antygeny z różną swoistością.

Ponieważ wszyscy mówią teraz o wągliku, rozpoczęliśmy niedawno badania nad produkcją szczepionki w roślinach. Jak dotąd udało nam się zainfekować liście tytoniu i sałaty antygenem ochraniającym (protective antigen) przed wąglikiem.

Technika biotechnologicznego wykorzystania roślin (plant technique) nie ogranicza się do stosowania wirusowych lub bakteryjnych antygenów. W tytoniu wyprodukowano dwa przeciwciała: jedno przeciw wściekliznie, a drugie przeciw antygenowi 73-3 raka jelita grubego (CO 17 – 1A). W transgenicznym tytoniu, a także w sałacie, ulegał ekspresji zarówno lekki, jak i ciężki łańcuch immunoglobuliny przeciwrakowej.

Posłowie

Nie ma dzisiaj szanującego się prelegenta, zajmującego się chorobami zakaźnymi, który nie poruszyłby

tematu bioterroryzmu. Niech moim przyczynkiem będzie opowieść o wenezuelskim, końskim zapaleniu mózgu (*Venezuelan equine encephalitis* – VEE). Kiedy przybyłem do miasta Maracay w Wenezueli, panowała tam właśnie epidemia VEE wśród niemowląt i małych dzieci. Urzędnik publicznej służby zdrowia zasugerował, bym zmierzył czas pomiędzy pojawianiem się w lokalnym szpitalu kolejnych indiańskich matek z chorymi dziećmi w ramionach. Ku memu zdumieniu, zjawiały się one co 3 minuty. Chorobę przenosiły moskity z zainfekowanych kaczek, żyjących na pobliskim jeziorze. Zainteresował mnie ten wirus, więc po powrocie do mojego laboratorium w Brazylii, gdy tylko otrzymałem ampulkę z wirusem, zacząłem ją otwierać, żeby przenieść jej zawartość na myszy. Moje manipulacje z przenoszeniem wirusa trwały niecałą godzinę i w tym czasie zaraziło się chorobą 14 osób w naszym laboratorium. Większość z tych ludzi nie miała nawet bezpośredniego kontaktu ze skażonymi przedmiotami.

Zaobserwowałem, iż nasilenie przebiegu choroby odzwierciedlało pozycję społeczną ofiary zakażenia. Ed Leannette – szef laboratorium – chorował ciężko przez 6 tygodni z napadami amnezji, bólami mięśniowymi (*myalgia*) i tym podobne. Ja, jako jego zastępca, byłem chory przez 4 tygodnie, z łagodniejszym przebiegiem infekcji. Nasi dwaj młodszy asystenci chorowali po tygodniu, a pomocnicy laboratoryjni i pracownicy zwierzętarni chorowali przez jeden dzień. Nie zanotowano ofiar śmiertelnych.

Gdyby wykorzystać VEE w wojnie biologicznej, infekcja powinna obezwładnić głównie dowodzącą generalicję, admiralicję i – miejmy nadzieję – ważnych polityków. U młodszych rangą i wiekiem szeregowców wystąpiłyby jedynie łagodne symptomy choroby. Czy są ochotnicy do użycia VEE w wojnie biologicznej?

Moje wystąpienie chciałbym zakończyć słowami George’a Sorosa: „The time is ripe for developing a conceptual framework based on our fallibility”.