

## Вакцинный потенциал рекомбинантных гриппозных векторов, экспрессирующих микобактериальные антигены, при экспериментальном туберкулезе

Н.В.Заболотных<sup>1</sup>, М.А.Стукова<sup>2</sup>, Т.И.Виноградова<sup>1</sup>, М.Л.Витовская<sup>1</sup>, А.-П.С.Шурыгина<sup>2</sup>, С.Н.Васильева<sup>1</sup>,  
П.К.Яблонский<sup>1</sup>, О.И.Киселев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России

<sup>2</sup>ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург

### РЕЗЮМЕ

Для создания противотуберкулезных вакцинных кандидатов с помощью методов обратной генетики сконструированы аттенуированные рекомбинантные штаммы вируса гриппа, экспрессирующие микобактериальные белки ESAT-6, TB10.4, Ag85B, Rv3407 в различных комбинациях. Изученные штаммы имели высокие ростовые характеристики на культуре клеток Vero, были генетически стабильны, экспрессия белков-вставок подтверждена *in vitro* и *in vivo*. Оценка эффективности одного из вакцинных кандидатов, экспрессирующего ранний секреторный белок ESAT-6 (FLU/ESAT-6), показала задержку развития экспериментального туберкулеза на уровне, по ряду показателей превышающем защитное действие стандартной вакцины БЦЖ. Интраназальный способ доставки туберкулезного антигена с помощью гриппозного вектора сопровождался формированием Тх-1 иммунного ответа в периферических органах иммунной системы, связанных с верхними дыхательными путями, что может иметь неоспоримые преимущества в защите от легочных форм туберкулеза.

Ключевые слова: туберкулез, вакцина, гриппозные векторы, профилактика, ESAT-6, Тх-1 иммунный ответ

### ВВЕДЕНИЕ

Необходимость совершенствования профилактической вакцинации туберкулеза, способной обеспечить эффективный контроль распространения инфекции, не вызывает сомнений. Сыграв большую положительную роль в предотвращении развития распространенных форм туберкулеза у детей и подростков, вакцина БЦЖ - живой аттенуированный штамм *Mycobacterium bovis* - во многом перестала удовлетворять требованиям практического здравоохранения. В последнее время развитие туберкулеза при контакте с бактериовыделителем отмечается не только у некачественно привитых или не привитых детей, но и у эффективно БЦЖ-вакцинированных [2]. По-прежнему серьезной, и даже имеющей тенденцию роста проблемой вакцинации БЦЖ остаются поствакцинальные осложнения, затрагивающие костную систему [1]. Существенным недостатком вакцины БЦЖ является снижение напряженности поствакцинального противотуберкулезного иммунитета уже через 2-3

года после вакцинации [3]. Неэффективность БЦЖ, как показано в работах последних лет, нередко определяется исходной поляризацией иммунного ответа в сторону Тх-2, вызванной дезинтеграцией субпопуляционного состава Т-лимфоцитов и паразитарными инвазиями [9].

Расшифровка иммунологических механизмов защиты от туберкулеза и идентификация антигенов, распознаваемых при протективных реакциях, открыли широкие возможности для разработки новых противотуберкулезных вакцин. К настоящему времени на различных стадиях доклинических и клинических исследований находятся более 10 вакцинных кандидатов, которые разрабатываются как с целью замены используемой вакцины БЦЖ, так и для проведения «бустерных» вакцинаций, способных длительно поддерживать специфический иммунитет на адекватном уровне [8]. Перспективным направлением в области разработки новых противотуберкулезных вакцин является создание препаратов, предназначенных для введения через дыхательные пути и ориентированных на формирование иммунного ответа в месте внедрения патогена [5].

С 2006 года в лаборатории экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий СПб НИИФ совместно с НИИ гриппа исследуется вакцинный потенциал аттенуированных рекомбинантных штаммов вируса гриппа с модифицированным геном NS1, экспрессирующих микобактериальные белки. За счет нарушения основной функции полноразмерного белка NS1 как антагониста системы интерферона I типа такие штаммы теряют способность к полноценной репликации в организме хозяина, что обеспечивает безопасность их использования в качестве вакцинных препаратов [4]. В то же время в зоне вирусной репликации происходит выработка большого количества цитокинов, способствующих поляризации иммунного ответа в сторону Тх-1 звена, обеспечивая иммуноадаъювантный эффект вирусов гриппа с модифицированным NS1 геном [11]. Иммунологические свойства конструкций подобного типа, а также возможность их интраназального введения определяют перспективы использования гриппозных векторов для защиты от туберкулеза, в контроле которого решающую роль играет развитие полноценного Тх-1 иммунного ответа [8, 9].

Целью настоящей работы явилась оценка

эффективности одного из вакцинных кандидатов, экспрессирующего ранний секреторный белок ESAT-6 (FLU/ESAT-6), в защите от экспериментальной

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конструирование рекомбинантных штаммов вируса гриппа. Рекомбинантные NS геномные фрагменты, содержащие последовательности, кодирующие микобактериальные белки ESAT-6, TB10.4, Ag85B, Rv3407 в различных комбинациях синтезированы и клонированы в двунаправленные экспрессионные плазмиды pHW\_B754 в компании Geneart AG (Регенсбург, Германия). В ряде конструкций с целью посттрансляционного разделения микобактериального белка с N-терминальной областью NS1 белка, между ними введена синтезированная последовательность (51 нуклеотид), кодирующая участок сайта узнавания клеточными протеазами белка 2A (NFDLLKLAGDVESNLGP) пикорновируса, который обладает свойством саморазрезания перед последним пролином. Плазмиды, кодирующие остальные геномные фрагменты вируса гриппа, за исключением HA, сконструированы на основе кДНК копий генов, полученных с матрицы вируса, стабильно экспрессирующего зеленый флуоресцентный белок GFP [6]. Клетки Vero (ВОЗ) получены из Европейской Коллекции Клеточных Культур (Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Великобритания) на 134 пассаже и росли в среде DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 2 mM L-glutamine. Для получения рекомбинантных штаммов использована техника трансфекции клеток Vero соответствующими плазмидами путем электропарации при помощи оборудования Nucleofector II (Аmaxa) в соответствии с инструкцией по использованию. Наличие рекомбинантного NS гена со вставкой нуклеотидных последовательностей, кодирующей микобактериальные белки в различных комбинациях, подтверждалось секвенированием продуктов ОТ-ПЦР.

Инфекционный титр вирусов определяли методом бляшкообразования на клетках Vero под 0,6% агаровым покрытием, с добавлением питательной среды DMEM/HamF12, 4мМ L-глутамина, 5мкг/мл трипсина, 0,01% DEAE-декстрана (Pharmacia), и выражали в бляшкообразующих единицах (БОЕ/мл).

Иммунизация животных и моделирование экспериментального туберкулеза. Эффект иммунизации рекомбинантными гриппозными векторами оценивали на 320 мышах - самцах линии C57 black/6 (питомник «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий РАН). Иммунизацию животных проводили двукратно интраназально, без наркоза, в дозе 106 БОЕ/животное, с интервалом 3 недели. Генерализованный туберкулезный процесс у мышей моделировали введением в латеральную хвостовую вену взвеси

трехнедельной культуры вирулентной культуры *M. tuberculosis* Erdman (106 КОЕ/мышь), полученной из Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Тарасевича, через 3 недели после второй иммунизации. Контролями служили зараженные невакцинированные животные (контроль заражения), иммунизированные PR/8 вирусом «дикого» типа в дозе 105 БОЕ/мышь (контроль вакцины) а также вакцинированные подкожно БЦЖ в дозе 105 КОЕ/мышь на первом сроке введения FLU/ESAT-6. Результаты оценивали через 6 недель после заражения. Выведение мышей из опыта осуществлялось с соблюдением Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований, предусматривающих гуманное отношение к животным. Эффект протективного действия FLU/ESAT-6 оценивали по показателям тяжести течения экспериментального туберкулезного процесса: летальность; динамика массы; гистологическое исследование легких, бактериологическое исследование легких и селезенки.

Для гистологического изучения легкие фиксировали в 10% формалине, заливали в целлоидин-парафин-масло, срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

При бактериологическом исследовании осуществляли дозированный посев гомогенатов легких и селезенки на плотную яичную среду Левенштейна-Йенсена методом серийных разведений. Нижняя граница чувствительности метода -  $2 \times 10^3$  КОЕ. Массивность роста МБТ выражали в десятичных  $\log$  (lg) от числа колониеобразующих единиц (КОЕ) на массу легких. Расчет индекса защиты органа проводился при вычитании lg КОЕ иммунизированных мышей из lg КОЕ мышей группы контроля заражения. При оценке результатов положительным эффектом по задержке роста МБТ считается индекс защиты  $\geq 0,5$  lg.

Определение продукции ИФН- $\gamma$  в супернатантах культур клеток селезенки и трахеобронхиальных лимфоузлов проводили с использованием иммуноферментных тест систем Quantikine™ (R&D Systems, Minneapolis) в соответствии с инструкцией по использованию. Уровень ИФН- $\gamma$  (пкг/мл) в исследуемых образцах рассчитывали по калибровочной кривой в зависимости оптической плотности и от концентрации цитокина.

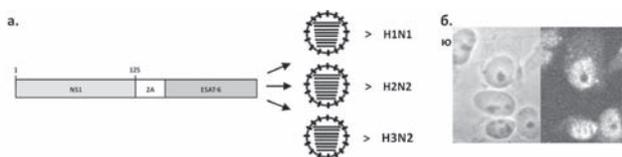
Статистическую обработку данных выполняли с использованием параметрического теста Стьюдента и непараметрического критерия Вилкоксона - Манна - Уитни.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Восемь рекомбинантных штаммов вируса гриппа, экспрессирующих микобактериальные белки ESAT-6, TB10.4, Ag85B, Rv3407 в различных комбинациях,

получены с помощью методов обратной генетики. При интраназальном заражении мышей в дозе 5,5 log БОЕ/мышь полученные штаммы обладали способностью размножения в легких животных до титров 1-1,5 БОЕ/мл 10% суспензии легких, не вызывая при этом гибели животных, т.е. являлись аттенуированными по сравнению с исходными родительскими штаммами. Отсутствие патологии в легких иммунизированных животных, а также снижения их массы тела, подтверждали аттенуацию штаммов. Генетические и молекулярные механизмы аттенуации гриппозных векторов и их безвредность для животных могут определяться как нарушением основной функции полноразмерного NS1 белка как антагониста системы интерферона I типа, так и отсутствием функциональных доменов в карбоксильной части NS1 белка, связанных с патогенностью вируса гриппа [4].

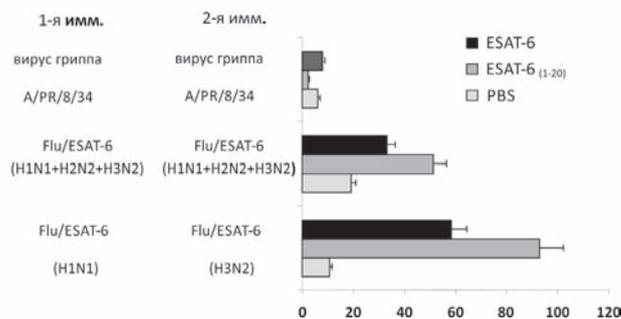
В качестве модельных штаммов для экспериментальной оценки иммуногенной и протективной активности вакцинных кандидатов выбраны рекомбинантные штаммы вируса гриппа трех антигенных подтипов (H1N1, H2N2 и H3N2), экспрессирующие ранний секреторный белок ESAT-6 (FLU/ESAT-6). Структура рекомбинантного NS гена представлена на рис. 1а. После нуклеотидной последовательности, кодирующей 125 аминокислот белка NS1 вируса гриппа, следует последовательность, кодирующая участок сайта узнавания клеточными протеазами белка 2А пикорновируса (NFDLLKLAGDVESNLG/P) вместе с последовательностью ESAT-6 (95 аминокислот). Экспрессия ESAT-6 белка подтверждена методом Вестернблот (данные не приводятся) и иммунофлюоресцентным анализом лизатов зараженных вирусом клеток Vero с использованием моноклональных антител к белку ESAT-6. На рисунке 1б отчетливо видно свечение ESAT-6 белка, накопившегося в ядре зараженных рекомбинантным вирусом клеток Vero.



**Рис.1** (а). Рекомбинантный NS1 ген, экспрессирующий ESAT-6 белок, был введен в вирусы гриппа А трех антигенных подтипов. (б). Иммунофлюоресценция: экспрессия ESAT-6 белка в ядре инфицированных клеток Vero.

Последовательная двукратная иммунизация мышей антигенно различными рекомбинантными вирусами Flu/ESAT-6 вызвала формирование существенного количества иммунореактивных CD4+ (Tx-1) лимфоцитов селезенки, которые уже через 10 дней после второй

иммунизации были способны отвечать на специфическую стимуляцию культур спленоцитов иммунизированных мышей продукцией ИФН-γ (рис.2).



**Рис. 2.** Количество ИФН секретирующих клеток в ответ на стимуляцию рекомбинантным ESAT-6 белком или ESAT-6 (1-20) пептидом, содержащим H-2b-рестриктированный CD4+ Т-клеточный эпитоп в популяции клеток, полученных из селезенки C57black/6 мышей через 10 дней после второй иммунизации Flu/ESAT-6 гриппозными векторами или вирусом гриппа A/PR/8/34 «дикого» типа.

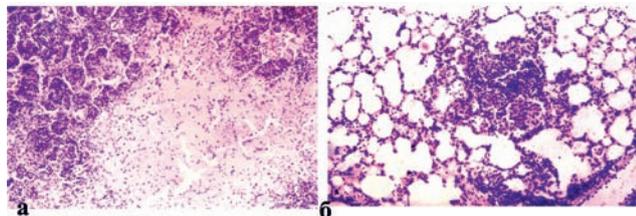
Таким образом, была подтверждена способность рекомбинантных гриппозных векторов индуцировать системный ESAT-6-специфичный CD4+ Tx-1 клеточный иммунный ответ при интраназальном введении, что послужило основанием исследования профилактической эффективности штаммов при экспериментальной туберкулезной инфекции.

Двукратная последовательная интраназальная иммунизация мышей гриппозными векторами подтипов H1N1 и H3N2, проведенная за 3 недели до внутривенного заражения животных вирулентным штаммом МБТ, позитивно отразилась на интегральных показателях тяжести течения туберкулеза - летальности и обсемененности органов микобактериями туберкулеза. В то время как у зараженных невакцинированных мышей (контроль заражения) начало гибели от туберкулеза отмечено на 59 день после заражения, у вакцинированных Flu/ESAT-6 животных оно наблюдалось на 69 день. У иммунизированных Flu/ESAT-6 мышей позднее зафиксирована и 100% летальность. Так, к 137 дню после заражения погибли все невакцинированные мыши, при вакцинации Flu/ESAT-6 - 55% животных (к 250 дню - 90%). При этом средняя продолжительность жизни привитых мышей составила дней, в группе контроля заражения дней ( $p < 0.008$ , Log Rank test). У мышей, вакцинированных БЦЖ, начало гибели отмечено на 64 день (на 5 дней раньше, чем при вакцинации Flu/ESAT-6), а 100% летальность - на 250 день после инфицирования.

Бактериологическими исследованиями установлено существенное снижение массивности роста МБТ в посевах гомогенатов легких и селезенки в группе мышей, вакцинированных FLU/ESAT-6 по сравнению с

контролем заражения. Через 6 недель после заражения обсемененность МБТ легких снизилась на  $1,4 \log_{10}$ , селезенки - на  $0,6 \log_{10}$ . Защитный эффект Flu/ESAT-6 гриппозных векторов по бактериологическим данным был на уровне показателей вакцины БЦЖ. В группе мышей, иммунизированных вирусом гриппа «дикого» типа (контроль вакцины), снижения роста МБТ в посевах гомогенатов органов не отмечено.

Гистологическая оценка срезов легочной ткани выявила, что у невакцинированных мышей через 6 недель после инокуляции *M. tuberculosis* Erdman специфическое воспаление было представлено полями и крупными свежими сливными очагами инфильтрации с накоплением в альвеолах серозного, а чаще фибринозного экссудата. Альвеолы, межальвеолярные перегородки и просветы расширенных капилляров были инфильтрованы эпителиоидными клетками, макрофагами, лимфоидными элементами. Скопления нейтрофильных гранулоцитов обнаружены у всех животных контрольной группы, в 6 из 10 случаев – с распадом и образованием ядерного детрита, а в 2-х – с фокусами деструкции в центре гранулемы (рис. 3).



**Рис. 3.** Микрофотография гистологических срезов легких мышей контрольной группы мышей, вакцинированных FLU/ESAT-6 через 6 недель после заражения МБТ. (а). Очаг инфильтрации с крупным фокусом деструкции в центре и скоплением ядерного детрита по периферии гранулемы  $\times 120$ . (б). Небольшой очаг инфильтрации на фоне сохранившихся альвеол в легких зараженных вакцинированных мышей  $\times 120$ .

Вакцинация мышей FLU/ESAT-6 привела к снижению распространенности специфического процесса и повышению воздушности легочной ткани. У большинства животных (86%) специфическое воспаление представлено небольшими очагами инфильтрации, преимущественно лимфоидного характера, состоящими из лимфоцитов, макрофагов, единичных эпителиоидных клеток и единичных нераспадающихся нейтрофилов (рис. 3б). Практически не обнаруживалось скоплений ядерного детрита, участков некроза и скоплений нейтрофильных гранулоцитов. У всех опытных животных зарегистрированы крупные периваскулярные и перибронхиальные лимфогистиоцитарные инфильтраты, что свидетельствует об активации напряженности местного иммунитета ткани легкого.

Известно, что в формировании протективного

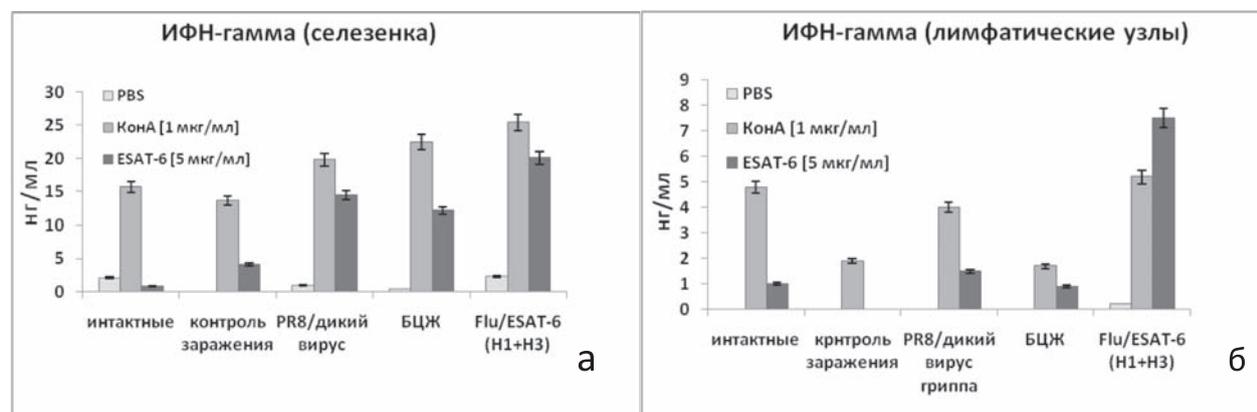
противотуберкулезного иммунитета ключевая роль принадлежит Т-хелперам первого типа, которые осуществляют контроль над развитием инфекции посредством выработки Тх-1 цитокинов, в первую очередь интерферона гамма [12]. В этой связи нами проведено исследование продукции ИФН- $\gamma$  в супернатантах культур селезенки и трахеобронхиальных лимфоузлов иммунизированных мышей в ходе экспериментальной туберкулезной инфекции. Через 2 недели после заражения, когда при визуальном осмотре легких зараженных МБТ мышей еще не выявлялись выраженные очаги туберкулезного поражения, у всех животных отмечено достоверное снижение спонтанного и повышение ESAT-6 - индуцированного уровня продукции ИФН- $\gamma$  ( $p < 0,001$ ), что согласуется с данными по высокому уровню продукции цитокина Т-лимфоцитами на ранних сроках развития туберкулезной инфекции [10].

Через 6 недель после заражения, по мере нарастания тяжести туберкулезного процесса, в контрольной группе зараженных невакцинированных мышей на фоне угнетения специфической пролиферативной активности клеток селезенки в РБТЛ (индекс стимуляции 0,63), отмечено существенное снижение выработки ИФН- $\gamma$  в культуре спленоцитов и полное угнетение продукции цитокина в культуре трахеобронхиальных лимфоузлов (рис.4).

При этом во всех группах иммунизированных мышей в культурах их спленоцитов отмечен достоверно более высокий уровень продукции ИФН- $\gamma$  по сравнению с контрольной группой животных ( $p < 0,002$ ). Важно отметить, что существенная выработка ИФН- $\gamma$  в супернатантах культур трахеобронхиальных лимфатических узлов зарегистрирована только в группе мышей, интраназально иммунизированных гриппозными векторами (рис.4б). Полученные данные свидетельствуют о том, что интраназальный способ доставки туберкулезного антигена с помощью гриппозного вектора имеет преимущества в формировании Тх-1 иммунного ответа в периферических органах иммунной системы, связанных с верхними дыхательными путями, что может иметь неоспоримые преимущества в защите от легочных форм туберкулеза, где наиболее значимой является продукция ИФН- $\gamma$  в непосредственном месте поражения микобактериями туберкулеза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование в данной работе рекомбинантных гриппозных векторов, экспрессирующих иммунодоминантный Т-клеточный микобактериальный антиген ESAT-6 (FLU/ESAT-6) для профилактики экспериментальной туберкулезной инфекции, позволило добиться развития протективного эффекта



**Рис 4.** Концентрации ИФН-гамма (нг/мл) в супернатантах трехдневных культур (а) спленоцитов и (б) трахеобронхиальных лимфоузлов через 6 недель после заражения иммунизированных мышей вирулентным штаммом МБТ и у интактных животных.

сопоставимого, а по ряду показателей превышающего эффект вакцины БЦЖ. Иммунизация мышей FLU/ESAT-6, проведенная за 3 недели до заражения вирулентным штаммом МБТ, привела к существенному увеличению секреции ИФН-γ спленоцитами в ответ на стимуляцию ESAT-6 белком. Развитие антиген специфичного Тх-1 клеточного ответа обеспечило задержку развития экспериментального туберкулеза и его более благоприятное течение по сравнению с контрольной группой зараженных невакцинированных животных.

Протективное действие FLU/ESAT-6 проявилось в снижении летальности, повышении средней продолжительности жизни животных, уменьшении обсемененности внутренних органов. Специфическое поражение у вакцинированных FLU/ESAT-6 животных характеризовалось меньшей распространенностью инфильтративного воспаления внутренних органов, снижением альтеративного компонента и активацией местного иммунитета легочной ткани.

В отличие от вакцины БЦЖ, предназначенной, прежде всего, для парентерального введения, рекомбинантная гриппозная вакцина может применяться интраназально, чем достигается активация мукозального иммунитета слизистых оболочек верхних дыхательных путей, которая может явиться дополнительным барьером при аэрогенном заражении туберкулезом.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аксенова В.А., Леви Д.Т., Фомина Е.В. и др. Вакцинопрофилактика туберкулеза: значение и проблемы // Пробл. туб. и болезней легких. - 2009. - №1. - С. 10-16.
- Морозов Ю.А., Хадеева П.В., Михайлова Л.В. Иммунопрофилактика туберкулеза вакциной БЦЖ у детей из контакта и из неустановленного контакта // Пробл. туб. и болезней легких. - 2005. - № 1. - С. 29-32.
- Санакоева Л.П. Специфические изменения фагоцитарной активности лейкоцитов крови у детей после вакцинации BCG // Пробл. туб. и болезней легких. - 2003. - № 8. - С. 40-43.
- Egorov A., Brandt S., Sereinig S. et al. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells // J. Virol. - 1998. - Vol. 72. - P.6437-6441.
- Hall L.J., Clare S., Dougan G. Probing local innate immune responses after mucosal immunisation // J Immune Based Ther Vaccines. - 2010. - Vol. 8, №5. - P.1-14.
- Kittel C., Sereinig S., Ferko B. et al. Rescue of influenza virus expressing GFP from the NS1 reading frame // Virology. - 2004. - Vol. 324. - P. 67-73.
- McShane H. Tuberculosis vaccines: beyond bacille Calmette-Guérin // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. - 2011. - Vol. 366, N1579. - P. 2782-2789.
- Ottenhoff T.H.M., Kaufmann S.H.E Vaccines against tuberculosis: where we are and where do we need to go. PLoS Pathogens. - 2012. - Vol. 8. - P. 1002607.
- Rafi W., Ribeiro-Rodrigues R., Ellner J.J., Salgame P. Co-infection helminthes and tuberculosis // Curr. Opin. HIV AIDS. - 2012. - Vol. 7, N 3. - P. 239-244.
- Russell D.G., Barry C.E., Flynn J.L. Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us // Science. - 2010. - Vol. 328. - P. 852-856.
- Stasakova J., Ferko B., Kittel C. et al. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18 // J Gen Virol. - 2005. - Vol. 86, N 1. - P.85-95.
- Zuñiga J., Torres-García D., Santos-Mendoza T. et al. Cellular and Humoral Mechanisms Involved in the Control of Tuberculosis // Clin. Dev. Immunol. - 2012. - doi: 10.1155/2012/193923.