

А.-П. С. Шурыгина¹, Г. Ф. Леонтьева², К. Б. Грабовская², Т. В. Гупалова², И. В. Королева², Т. А. Крамская²,
О. И. Киселев¹, А. Ю. Егоров^{1,3}, А. Н. Суворов²

Комбинированное применение для интраназальной иммунизации рекомбинантных полипептидов стрептококков группы В и живой противогриппозной вакцины с удаленным NS1-геном

¹ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, лаборатория молекулярной вирусологии и геной инженерии, Санкт-Петербург; ²ФГБУ НИИЭМ СЗО РАМН, лаборатория молекулярной генетики патогенных микроорганизмов, Санкт-Петербург;
³Компания «АВИР ГринХилзБиотехнология АГ», Вена

На мышах линии Balb/c исследовали иммуoadъювантные свойства вакцинного штамма вируса гриппа с удаленным геном NS1 при совместном интраназальном введении с рекомбинантными полипептидами СГВ. Показано, что комбинированное применение рекомбинантных белков СГВ и живой противогриппозной вакцины с удаленным NS1-геном приводит к повышению иммуногенности бактериального препарата и усилению его защитных свойств в отношении СГВ-инфекции, развивающейся на фоне гриппа. Совместное использование вакцинного препарата на основе рекомбинантных белков СГВ и Δ NS1-противогриппозной вакцины может не только быть средством профилактики заболеваний, вызванных СГВ, но и усиливать защитный эффект гриппозной вакцины за счет профилактики бактериальных осложнений гриппа.

Ключевые слова: стрептококки группы В, грипп, вакцина, NS1

Intranasal Co-administration of Recombinant Streptococcus Group B Polypeptides and Influenza Δ NS1 Vaccine

A.-P. S. Shurygina¹, G. F. Leont'eva², K. B. Grabovskaya², T. V. Gupalova², I. V. Koroleva²,
T. A. Kramskaya², O. I. Kiselev¹, A. Y. Egorov^{1,3}, and A. N. Suvorov²

¹Federal State Research Institute of Influenza, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia; ²Institute of Experimental Medicine, North-West Branch, Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russia; ³AVIR Green Hills Biotechnology AG, Vienna, Austria

In the present work, the immunoadjuvant properties of the influenza Δ NS1 vaccine virus after intranasal administration in combination with recombinant GBS polypeptides was tested in mice. According to our data, co-administration of recombinant GBS polypeptides and influenza Δ NS1 vaccine resulted in the increase in the immunogenicity and protective efficacy of bacterial proteins. Combined vaccination with the GBS polypeptides and influenza Δ NS1 vaccine has a potential to be used not only for prophylaxis infections caused by SGB, but also for prevention of the bacterial complications of influenza.

Key words: streptococcus group B, influenza, vaccine, NS1

Патогенные стрептококки относятся к наиболее распространенным возбудителям бактериальных инфекций человека. Заболевания, вызываемые стрептококками группы В (СГВ) или *Streptococcus agalactiae*, в большинстве стран мира рассматриваются в качестве важной социально-экономической и медицинской проблемы. Являясь причиной серьезных патологий беременности, высокой смертности новорожденных, детей младшего возраста, пожилых лиц и пациентов с иммунодефицитами, СГВ способны вызывать не только первичную инфекцию, но и вторичные осложнения после респираторных вирусных инфекций, в том числе гриппа [6]. Антибиотики, широко применяемые для лечения и профилактики заболеваний, вызываемых СГВ, нередко оказываются неэффективными в силу увеличения числа антибиотикоустойчивых штаммов, дают широкий спектр побочных эффектов у людей. Это определяет актуальность поиска новых средств и способов специфической профилактики инфекций, вызываемых СГВ. Разработка эффективной СГВ-вакцины проводится более 20 лет. В качестве возможных ком-

понентов вакцинного препарата рассматриваются различные бактериальные антигены (АГ), в том числе полисахариды капсулы и поверхностные белки СГВ [3]. Перспективным направлением является создание универсальной СГВ-вакцины на основе рекомбинантных аналогов поверхностных белков СГВ, имеющих в своем составе консервативные последовательности, общие для большинства серотипов СГВ и ряда других грамположительных бактерий [10]. Для индуцирования полноценного иммунного ответа при интраназальном введении рекомбинантных бактериальных белков, как правило, требуется добавление адъюванта [8].

В настоящей работе исследовали иммуoadъювантные свойства вакцинного штамма вируса гриппа с удаленным геном NS1 при совместном интраназальном введении с рекомбинантными полипептидами СГВ. Известно, что при интраназальном введении вирусы гриппа с удаленным NS1-геном стимулируют выработку значительного количества интерферонов 1-го типа и других цитокинов и хемокинов [2, 9]. Мы предположили, что данное свойство Δ NS1-вирусов не

Контактная информация:

Шурыгина Анна-Полина Сергеевна, мл. науч. сотр.; e-mail: shurygina@influenza.spb.ru

только обеспечивает развитие полноценного противовирусного ответа, но и способно определить их иммуноадаптивные свойства при комбинированном введении с другими АГ.

Материалы и методы

Получение рекомбинантных белков стрептококков группы В. Рекомбинантные полипептиды СГВ Р6, SspB1, ScaAB и Pb3a были клонированы в системе экспрессионных векторов pQE («Qiagen», США) с последующей очисткой с помощью аффинной хроматографии на Ni-сефарозе, как описано в работе [5]. Непосредственно перед вакцинацией все 4 белковых компонента были смешаны в эквивалентных концентрациях (10 мкг/белок/мышь).

Получение живой противогриппозной вакцины с удаленным NS1-геном. Вакцинный вирус ΔNS1-H1N1 был получен методом обратной генетики, как описано в работе [7], с минимальными модификациями. ΔNS1-H1N1 содержит поверхностные гликопротеины вируса гриппа A/NC/20/99, а оставшиеся 6 генетических сегментов, кодирующих белки PB2, PB1, PA, NP, M и NS с удаленной открытой рамкой считывания NS1-гена, происходят от вакцинного штамма IVR-116, рекомендованного ВОЗ для производства гриппозных вакцин. Культивирование вакцинного вируса производили на клетках Vero, адаптированных к росту в бессывороточной среде (OptiPro SFM, «Invitrogen»).

Иммунизация и контрольное заражение. В работе были использованы самки мышей линии Balb/c в возрасте 8–10 нед (питомник лабораторных животных

ГОУ, филиал «Столбовая», Московская область). Все исследования выполнены согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 266 МЗ РФ от 19.06.03). Животным (по 10 мышей в группе) двукратно (0-й день, 21-й день) под легким эфирным наркозом интраназально в объеме 0,05 мкл вводили белки СГВ, ΔNS1-H1N1-вакцину ($1 \cdot 10^6$ ТИД₅₀/мл/животное) или их комбинацию. В качестве контроля использовали физиологический раствор. Образцы сывороток крови собирали из нижнечелюстной вены до второй иммунизации (21-й день) и на 35-й и 42-й день от начала эксперимента. Сывороточные АТ к ΔNS1-H1N1-вакцине определяли в реакции торможения геммагглютинации; АТ к полипептидам СГВ – методом ИФА. На 43-й день все животные были заражены сублетальной дозой контрольного вируса гриппа (В/Тюрингия 6:2 wt $1 \cdot 10^5$ ТЦД₅₀/мл/животное), а через 24 ч (44-й день) всем животным интраназально были введены СГВ I be в дозе $2 \cdot 10^8$ КОЕ/животное. Через 5 и 24 ч после бактериального заражения был произведен забор легких и селезенки. Вирусную нагрузку определяли в 10% (m/V) гомогенатах легких методом предельных разведений на клетках Vero. Титр бактерий в легких и селезенках определяли, высевая 10-кратные разведения тканевых гомогенатов на 5% кровяной агар.

Результаты и обсуждение

Комбинированное интраназальное введение рекомбинантных полипептидов СГВ и живой противогриппозной вакцины с удаленным NS1-геном усиливает иммунный ответ к белкам СГВ. Оценку иммуногенности

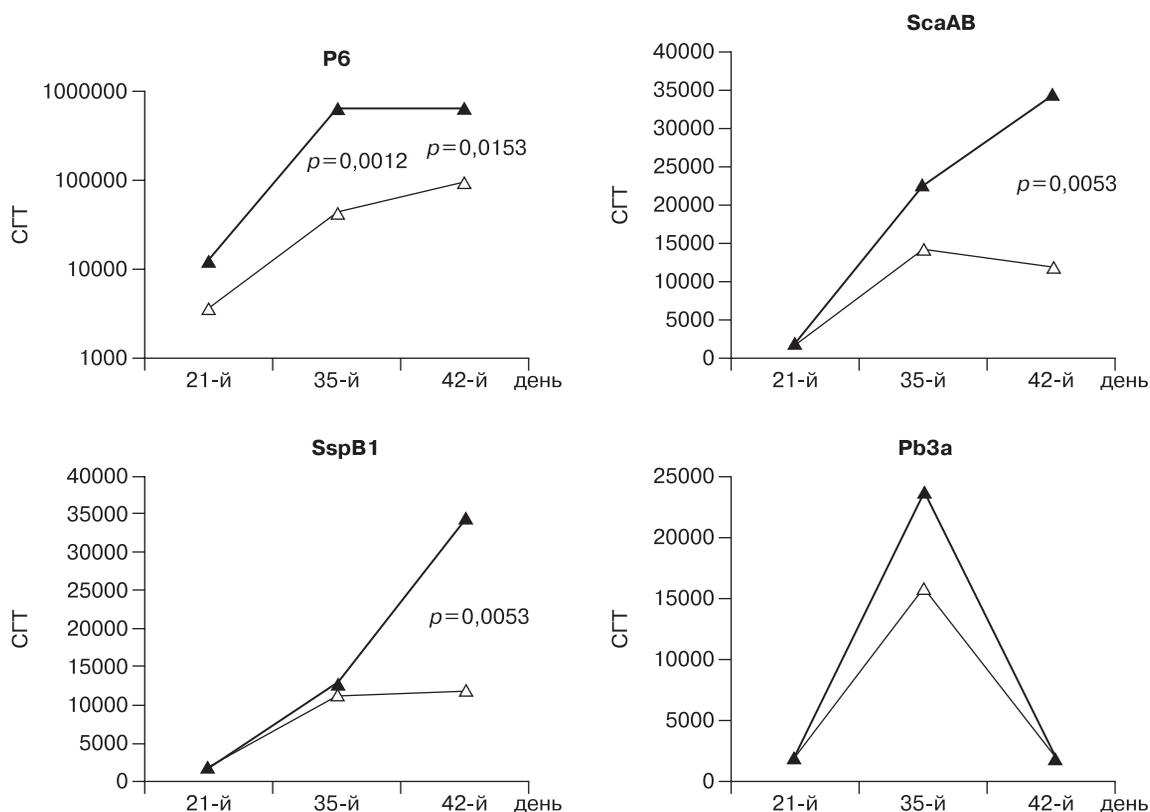


Рис. 1. Динамика содержания бактериоспецифических антител в сыворотках крови мышей, иммунизированных бактериальным и вирусно-бактериальным препаратами (по данным ИФА).

Титры АТ представлены как SCT. Белые символы – группа, иммунизированная белками СГВ. Черные символы – группа, иммунизированная белками СГВ в комбинации с живой противогриппозной вакциной с удаленным NS1-геном. $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

рекомбинантных полипептидов СГВ проводили методом определения сывороточных IgG в ИФА (рис. 1). Наиболее высокие титры IgG наблюдались к белку Р6. Даже после первой иммунизации (21-й день) в группе, получившей только белки СГВ (Strepto), средний геометрический титр (СГТ) анти-Р6-IgG составил 3668 (2000–8000) и значительно возрос после повторной иммунизации (35-й день: СГТ 43 069 (8000–256 000) с тенденцией к дальнейшему увеличению (42-й день; СГТ 95 104 (32 000–128 000)). Для других белков рост титров сывороточных АТ выше базового уровня удавалось достичь только после двукратной иммунизации (35-й день). СГТ к ScaAB составил 14 254 (4000–32 000), к SspB1 – 11 314 (2000–16 000) и к Pb3a – 16 000 (4000–32 000).

Совместное интраназальное введение белков СГВ и живой противогриппозной вакцины с удаленным NS1-геном приводило к увеличению уровня сывороточных АТ ко всем белкам СГВ и вакцины. Наиболее выраженный адьювантный эффект ΔNS1-вакцины наблюдался для белка Р6: многократный прирост СГТ в группе Strepto + ΔNS1 по сравнению с группой, иммунизированной белками СГВ отдельно (Strepto), составил 3 (21-й день), 15 (35-й день) и 7 (42-й день). Для белков ScaAB и SspB1 комбинированное введение препаратов также обеспечило более высокий и продолжительный IgG-ответ. Примечательно, что уровень IgG к этим белкам при использовании СГВ-полипептидов отдельно достиг максимума на 35-й день и не имел тенденции к дальнейшему увеличению, а в случае ScaAB даже несколько снижался к 42-му дню исследования, в то время как в группе, получившей оба препарата, наблюдался значимый прирост сывороточных АТ к 35-му и 42-му дню исследования, а разница в СГТ между группами достигла статистической значимости (тест Манна-Уитни $p < 0,05$). Наиболее кратковременная выработка сывороточных АТ и наименее выраженный адьювантный эффект ΔNS1-вакцины был отмечен для Pb3a-белка. Несмотря на то что на 35-й день в группе Strepto + ΔNS1 произошло некоторое повышение СГТ IgG [23 776 (16 000–32 000)] по сравнению с группой, получившей СГВ-белки отдельно [СГТ 16 000 (4000–32 000)], к 42-му дню исследования уровень сывороточных АТ

Содержание СГВ в легких мышей через 5 и 24 ч после заражения

Группа	5 ч после заражения		24 ч после заражения	
	число защищенных животных*	средний титр СГВ**	число защищенных животных*	средний титр СГВ**
ΔNS1	0/5	5,55 ± 0,65	3/5	2,24 ± 0,46***
Strepto	0/5	5,61 ± 0,03***	5/5	< 1,5
Strepto + ΔNS1	1/5	2,98 ± 0,71***	5/5	< 1,4
Контроль	0/5	5,13 ± 0,61	0/5	4,35 ± 0,33***

Примечание. * – мыши с бактериальной нагрузкой в тканях легких < 1,5 Ig КОЕ/мл считались защищенными; ** – титры представлены в Ig КОЕ/мл 10% суспензии гомогената ткани легких ± стандартная ошибка для группы из 5 животных. Образцы, в которых вирус не был обнаружен, оценивали как содержащие СГВ в дозе 1,5 Ig КОЕ/мл для расчета средних титров; *** $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни.

по отношению к белку Pb3A в обеих группах снижался до базового уровня. В группе отрицательного контроля и в группе, получившей только ΔNS1-H1N1-вакцину, IgG-ответ к белкам СГВ не наблюдали.

Комбинированное интраназальное введение рекомбинантных полипептидов СГВ и ΔNS1-H1N1-вакцины усиливает протективную эффективность в отношении СГВ. Для оценки эффективности комбинированной вакцинации мыши, получившие 2 дозы исследуемых препаратов, были подвергнуты вирусно-бактериальному заражению. Поскольку иммунизацию проводили вирусом гриппа А (H1N1), для провокации бактериальной пневмонии на фоне гриппозной инфекции был использован вирус гриппа В. Это позволило исключить возможность реализации защитного потенциала специфического противовирусного иммунитета, обусловленного вакциной подтипа H1N1. Через 48 ч после контрольного заражения вирус гриппа В определялся в легких животных всех исследуемых групп без значительного различия в титрах.

Через 5 ч после бактериального заражения наименьшее содержание СГВ наблюдалось в группе Strepto+ΔNS1 (2,98 КОЕ/мл). В группах, в которых животные были иммунизированы отдельно полипептидами СГВ (Strepto) или ΔNS1-вакциной, и в группе контроля средний титр СГВ составил 5,5, 5,61 и 5,13 Ig КОЕ/мл соответственно. Через 24 ч после бактериального заражения СГВ обнаруживали только в группе контроля и группе, получившей одну ΔNS1-вакцину (см. таблицу).

В обеих группах, получивших полипептиды СГВ, как отдельно (Strepto), так и в комбинации с ΔNS1-вакциной (Strepto + ΔNS1), стрептококк присутствовал только в легких. В контрольной группе и группе, вакцинированной ΔNS1-H1N1, СГВ обнаруживали также в селезенке, что свидетельствовало о бактериемии (рис. 2).

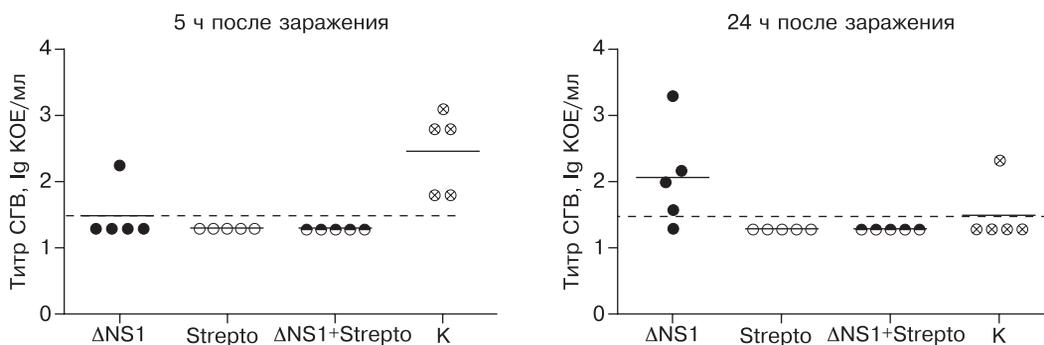


Рис. 2. Содержание СГВ в селезенках мышей через 5 и 24 ч после заражения (по данным титрования на кровяном агаре).

NS1 – группа, иммунизированная живой противогриппозной вакциной; Strepto – группа, иммунизированная белками СГВ; Strepto + ΔNS1 – группа, иммунизированная белками СГВ в комбинации с живой противогриппозной вакциной с удаленным NS1-геном; К – контрольная группа. Индивидуальные титры бактерий, выраженные в Ig КОЕ/мл, представлены отдельными символами; горизонтальные линии обозначают среднее значение. Пунктирной линией обозначен лимит чувствительности метода (1,5 Ig КОЕ/мл). Мыши с бактериальной нагрузкой в тканях селезенки < 1,5 Ig КОЕ/мл считались защищенными.

Хорошо известно, что большинство антигенов полипептидной природы являются слабыми иммуногенами, особенно при условии мукозальной вакцинации. Вместе с тем такой способ вакцинации считается оптимальным для профилактики инфекций, вызываемых патогенами, которые колонизируют поверхности респираторного, желудочно-кишечного и урогенитального тракта [4].

В работе описан феномен повышения эффективности интраназальной иммунизации рекомбинантными белками СГВ при их одновременном введении с живой противогриппозной вакциной с удаленным NS1-геном. Ранее протективная эффективность рекомбинантных белков СГВ была показана при условии их подкожного введения с гидроокисью алюминия в качестве адъюванта [10].

Предпринятое нами совместное введение вирусно-бактериального препарата сопровождалось усилением системного иммунного ответа к бактериальным полипептидам, особенно после повторной иммунизации. Стимулирующий эффект гриппозной вакцины коррелировал с показателями собственной иммуногенности рекомбинантных полипептидов, наивысший прирост наблюдали в отношении полипептида P6. Самой слабой иммуногенностью при интраназальном введении обладал полипептид P63a, иммуногенность которого при подкожном способе вакцинации была ранее продемонстрирована [1]. Возможно, отсутствие иммунного ответа на этот полипептид обусловлено особенностями его структуры и связано с быстрым разрушением протеолитическими ферментами, которыми богаты слизистые секреты.

Опосредованная введением гриппозной вакцины стимуляция иммунного ответа на бактериальные антигены сопровождалась повышением устойчивости мышей к заражению массивной дозой СГВ. У мышей, получивших вирусно-бактериальный препарат, наблюдалось ускоренное выведение СГВ из легких и полностью отсутствовала бактериемия.

Адъювантный эффект ΔNS1-гриппозной вакцины может быть связан с тем, что при интраназальном введении вирусы с удаленным NS1-геном вызывают локальную выработку широкого спектра провоспалительных цитокинов, хемокинов и интерферонов I-го типа, что приводит к эффективной активации специфического гуморального и клеточного иммунного ответа [9].

Следует отметить, что в группе мышей, получивших обе вакцины, по данным РТГА также наблюдалось повышение СГТ вирусспецифических сывороточных АТ более чем в 2 раза по сравнению с группой, иммунизированной только ΔNS1-H1N1-вакциной (ΔNS1: 69,8 (8–256); Strepto + ΔNS1: 139,6 (32–256)), что позволяет говорить о возможном эффекте синергизма при комбинированной вакцинации и рассчитывать на повышение защитного эффекта ΔNS1-вакцины в отношении вируса гриппа.

В экспериментах для иммунизации был использован вирус гриппа А/H1N1, в то время как бактериальная инфекция проходила на фоне развития гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа В. Мы намеренно исключили возможность реализации защитного потенциала противовирусного иммунитета,

и протективная эффективность рекомбинантной полипептидной вакцины против СГВ была изучена нами на модели смешанной вирусно-бактериальной инфекции. Одновременная интраназальная вакцинация вирусно-бактериальным комплексным препаратом обеспечила развитие СГВ-специфического иммунного ответа, способного ограничить развитие вторичной бактериальной инфекции.

Примечательно, что вакцина ΔNS1-H1N1, не оказывая специфическое защитное действие на вирус гриппа В (через 48 ч после заражения вирус определялся в легких животных всех исследуемых групп без значительного различия в титрах), обеспечивала определенную степень неспецифической защиты от бактериальной инфекции. По сравнению с группой контроля у мышей, иммунизированных только гриппозной вакциной, наблюдались задержка в развитии бактериемии (см. рис. 2) и ускоренное очищение легких от СГВ (см. таблицу). Данное наблюдение требует дальнейшего изучения.

Полученные нами результаты позволяют заключить, что комбинированное применение рекомбинантных белков СГВ и живой противогриппозной вакцины с удаленным NS1-геном приводит к повышению иммуногенности бактериального препарата и усилению его защитных свойств в отношении СГВ инфекции, развивающейся на фоне гриппа. Совместное использование вакцинного препарата на основе рекомбинантных белков СГВ и ΔNS1-противогриппозной вакцины может не только быть средством профилактики заболеваний, вызванных СГВ, но и усиливать защитный эффект гриппозной вакцины за счет профилактики бактериальных осложнений гриппа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Суворов А. И., Королева И. В., Грабовская К. Б. и др. Рекомбинантные полипептиды на основе С5а пептидазы как потенциальные компоненты вакцин против стрептококка группы В. Медицинская иммунология. 2011; 1: 41–8.
2. Ferko B., Stasakova J., Romanova J. et al. Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes. J. Virol. 2004; 78: 13 037–45.
3. Johri A. K., Paoletti L. C., Glaser P. et al. Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. Nat. Rev. Microbiol. 2006; 4: 932–42.
4. Kiyono H., Fukuyama S. NALT-versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. Nat. Rev. Immunol. 2004; 4: 699–710.
5. Мерингова Л. Ф., Леонтьева Г. Ф., Грабовская К. Б., Гупалова Т. В., Толоян А. А., Суворов А. Н. Иммуногенность модифицированного декстраном рекомбинантного фрагмента белка Вас стрептококков группы В. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2007; 2: 32–8.
6. Peltola V. T., McCullers J. A. Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase. Pediatr. Infect. Dis. J. 2004; 23 (1, suppl.): S87–97.
7. Pleschka S., Jaskunas R., Engelhardt O. G. et al. A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus. J. Virol. 1996; 70: 188–92.
8. Reed S. G., Bertholet S., Coler R. N. et al. New horizons in adjuvants for vaccine development. Trends Immunol. 2009; 30: 23–32.
9. Romanova J., Krenn B. M., Wolschek M. et al. Preclinical evaluation of a replication-deficient intranasal DeltaNS1 H5N1 influenza vaccine. PloS one. 2009; 4: e5984.
10. Суворов А. Н., Грабовская К. Б., Леонтьева Г. Ф., Мерингова Л. Ф., Королева И. Н., Дуплик Н. В., Толоян А. А. Рекомбинантные фрагменты консервативных белков стрептококков группы В как основа специфической вакцины. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2010; 2: 44–50.

Поступила 31.05.1