

Сергеева М.В.<sup>1,2</sup>, Пулькина А.А.<sup>1,2</sup>, Васильев К.А.<sup>1</sup>, Романовская-Романько Е.А.<sup>1</sup>, Комиссаров А.Б.<sup>1,3</sup>, Кучур О.А.<sup>3</sup>, Егоров А.Ю.<sup>1</sup>, Цыбалова Л.М.<sup>1</sup>, Стукова М.А.<sup>1</sup>

## БЕЗОПАСНОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ ХОЛОДОАДАПТИРОВАННОГО ГРИППОЗНОГО ВЕКТОРА, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО АНТИГЕНА ESAT-6 И Ag85A *M. TUBERCULOSIS*

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», 195251, г. Санкт-Петербург;

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», 199034, г. Санкт-Петербург

Использование рекомбинантных вирусных векторов является одним из наиболее перспективных подходов к созданию вакцин нового поколения против туберкулеза. Нами получен вакцинный кандидат на основе холодоадаптированного гриппозного вектора с укороченным белком NS1, содержащий вставку микобактериальных антигенов ESAT-6 и Ag85A. Рекомбинантный гриппозный вектор обладал холодоадаптированным и температурочувствительным фенотипом и был аттенуирован для мышей при интраназальном введении. Методами иммунофлюоресцентного окрашивания и Вестерн-блот показана экспрессия белка ESAT-6 при заражении клеток MDCK. При интраназальном введении мышам рекомбинантный вирус стимулировал специфический противотуберкулезный CD4<sup>+</sup>-Т-клеточный ответ Th1-типа с образованием полифункциональных антигенспецифических Т-клеток.

Ключевые слова: векторная вакцина; антигены *M. tuberculosis*; белок NS1 вируса гриппа; холодоадаптированный гриппозный вектор; рекомбинантный штамм.

**Для цитирования:** Сергеева М.В., Пулькина А.А., Васильев К.А., Романовская-Романько Е.А., Комиссаров А.Б., Кучур О.А., Егоров А.Ю., Цыбалова Л.М., Стукова М.А. Безопасность и иммуногенность холодоадаптированного гриппозного вектора, экспрессирующего антигены ESAT-6 и Ag85A *M. tuberculosis*. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(6): 266-272. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-266-272>

Sergeeva M.V.<sup>1,2</sup>, Pulkina A.A.<sup>1,2</sup>, Vasiliev K.A.<sup>1</sup>, Romanovskaya-Romanko E.A.<sup>1</sup>, Komissarov A.B.<sup>1,3</sup>, Kuchur O.A.<sup>3</sup>, Egorov A.Yu.<sup>1</sup>, Tsybalova L.M.<sup>1</sup>, Stukova M.A.<sup>1</sup>

## SAFETY AND IMMUNOGENICITY OF COLD-ADAPTED RECOMBINANT INFLUENZA VECTOR EXPRESSING ESAT-6 AND Ag85A ANTIGENS OF *M. TUBERCULOSIS*

<sup>1</sup> Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation;

<sup>2</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251, Russian Federation;

<sup>3</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, Russian Federation

Recombinant viral vectors represent one of the most promising platforms for creating a new generation of vaccines against tuberculosis. We constructed a vaccine candidate based on a cold-adapted influenza vector with a truncated NS1 protein containing an insert of tuberculosis ESAT-6 and Ag85A antigens. The recombinant virus possessed a cold-adapted and temperature-sensitive phenotype and was attenuated for mice when administered intranasally. Immunofluorescent staining and Western blot showed the expression of ESAT-6 protein in MDCK cells infected by recombinant virus. After intranasal administration to mice, the recombinant virus stimulated a specific anti-tuberculosis CD4 + Th1-type response with the formation of polyfunctional antigen-specific T cells.

Key words: vectored vaccine; *M. tuberculosis* antigen; influenza NS1 protein; cold-adapted influenza vector; recombinant virus.

**For citation:** Sergeeva M.V., Pulkina A.A., Vasiliev K.A., Romanovskaya-Romanko E.A., Komissarov A.B., Kuchur O.A., Egorov A.Yu., Tsybalova L.M., Stukova M.A. Safety and immunogenicity of cold-adapted recombinant influenza vector expressing ESAT-6 and Ag85A antigens of *M. tuberculosis*. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(6): 266-272. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-266-272>

**For correspondence:** Mariya V. Sergeeva, PhD, Leading researcher, Laboratory of vectored vaccines, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: [mari.v.sergeeva@gmail.com](mailto:mari.v.sergeeva@gmail.com), [maria.sergeeva@influenza.spb.ru](mailto:maria.sergeeva@influenza.spb.ru)

### Information about authors:

Sergeeva M.V., <http://orcid.org/0000-0003-0411-9896>; Komissarov A.B., <http://orcid.org/0000-0003-1733-1255>; Tsybalova L.M., <http://orcid.org/0000-0002-1193-5907>; Stukova M.A., <http://orcid.org/0000-0002-2127-3820>

**Acknowledgements.** The authors are grateful to E.A. Sorokin, Head of the Laboratory for biotechnology of diagnostic products, Research Institute of Influenza, for 1H7 antibodies.

This work was supported by the Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises (UMNIK Grant No. 7934GU/2015) and St. Petersburg Government Award to grant winning students in 2016.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 17 August 2017

Accepted 25 August 2017

**Для корреспонденции:** Сергеева Мария Валерьевна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаб. векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: [mari.v.sergeeva@gmail.com](mailto:mari.v.sergeeva@gmail.com), [maria.sergeeva@influenza.spb.ru](mailto:maria.sergeeva@influenza.spb.ru)

## Введение

Несмотря на достигнутые успехи в борьбе с туберкулезом, проблема распространения инфекции остается актуальной. По данным ВОЗ, на 2015 г. было зарегистрировано 10,4 млн новых случаев туберкулеза, из них 1,8 млн с летальным исходом [1].

Эффективность единственной противотуберкулезной вакцины БЦЖ (BCG, *Bacillus Calmette—Guerin*), являющейся живым аттенуированным штаммом *Mycobacterium bovis*, преимущественно ограничена ранним детским возрастом. В дальнейшем поствакцинальный иммунитет снижается, и даже повторно вакцинированные лица находятся под угрозой реактивации латентных очагов эндогенной инфекции и экзогенной реинфекции [2]. В исследованиях последних лет обосновано применение буст-вакцинации, направленной на поддержание и усиление БЦЖ-опосредованного специфического иммунитета на адекватном уровне [3].

К наиболее перспективным современным средствам борьбы с инфекционными заболеваниями относятся векторные вакцины на основе аттенуированных рекомбинантных вирусов, которые при введении человеку или животным способны синтезировать не только собственные белки, но и протективные антигены других патогенных вирусов или бактерий. Среди разрабатываемых векторных вакцин для защиты от туберкулеза наиболее широко используют модифицированный вирус осповакцины и репликативно-дефектные аденовирусы различных серотипов, несущих протективные антигены возбудителя туберкулеза. В последние годы ведутся работы по использованию в качестве вектора аттенуированного вируса гриппа [1].

Гриппозный вектор имеет ряд преимуществ перед другими вирусными векторами, среди которых отсутствие ДНК-стадии в репликативном цикле вируса, что исключает хромосомную интеграцию вирусного генома; возможность интраназального введения и формирования иммунного ответа в месте внедрения микобактериального патогена — на уровне слизистых оболочек; доказанная безопасность живых гриппозных вакцин; внутриклеточная выработка достаточного количества белка-вставки для получения защитного эффекта вакцинации [4]. Сконструированные к настоящему времени гриппозные векторы включают как полноразмерные антигены *M. tuberculosis*, такие как ESAT-6, Ag85A [5—7], так и их отдельные участки, содержащие Т-клеточные эпитопы Ag85B<sub>240-254</sub>, TB10.4<sub>3-11</sub> [8].

Аттенуация гриппозного вектора может быть достигнута путем удаления части (укорочения) NS1-белка [9, 10], являющегося антагонистом системы интерферонов (ИФН) I типа [11]. Эффективным подходом к повышению безопасности гриппозного вектора может быть использование в качестве основы для создания вакцинного штамма холодадаптированного штамма-донора аттенуации A/Hong Kong/1/68/162/35 [HK/162/35], который обладает полигенным признаком аттенуации, обеспеченным мутациями во всех генах внутренних и неструктурных белков [12, 13].

В рамках данной работы нами был сконструирован холодадаптированный гриппозный вектор с укороченным белком NS1, содержащий вставку туберкулёзных антигенов ESAT-6 и Ag85A, проведено исследование его аттенуации и иммуногенности на животных.

## Материал и методы

**Плазмиды.** Последовательность генного сегмента NS вируса гриппа HK/162/35, кодирующая укороченный до 80 аминокислот белок NS1 и вставку туберкулёзных белков Ag85A и ESAT-6 с сайтом расщепления 2A между ними, была синтезирована *de novo* и клонирована в вектор pHW2006 в компании «Евроген» (Россия). Плазмиды, кодирующие остальные сегменты вирусов гриппа HK/162/35 и A/PR/8/34 (H1N1) [PR8], были получены из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа».

**Вирусы.** Рекомбинантный штамм A/PR8/HK-NS80-E85A, содержащий поверхностные антигены HA и NA вируса гриппа PR8, внутренние гены штамма-донора HK/162/35, в том числе ген NS со вставкой туберкулёзных антигенов Ag85A и ESAT-6, был получен методом обратной генетики, как описано ранее [13]. Вирус A/PR8/HK-NS80 — делеционный вариант штамма A/PR8/HK-NS80-E85A, утратившего гетерологичную вставку, был получен в процессе пассажей в развивающихся куриных эмбрионах (ПКЭ). Рекомбинантный вирус A/PR8-NS124-ESAT6 (H1N1) на основе штамма PR8, содержащий укороченный до 124 аминокислот NS1 и вставку ESAT-6, был получен ранее [5]. Вирус PR8 с полноразмерным NS1 и реассортант A/PR8/HK 6:2/RG (гены HA, NA штамма PR8, остальные гены штамма HK/162/35), также были получены методом обратной генетики.

**Лабораторные животные.** В работе были использованы мыши линий BALB/c и C57/black, полученные из питомника «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России. При исследованиях руководствовались правилами работы с лабораторными животными<sup>1,2</sup>.

**Культивирование вирусов и определение фенотипа.** Вирусы культивировали в 10-дневных ПКЭ при оптимальной температуре инкубации 34°C. Наличие температурочувствительного (ts-) и холодадаптированного (са-) фенотипа определяли по показателям инфекционной активности при повышенной (39°C) и пониженной (26°C) температуре инкубации, как описано ранее [13], и выражали в логарифмах 50% эмбриональной инфекционной дозы (lg ЭИД<sub>50</sub>/мл).

**Постановка ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и секвенирование.** Вирусную РНК выделяли с использованием набора RNeasy Mini Kit («Qiagen»). Амплификацию фрагментов гена NS проводили методом ОТ-ПЦР с использованием специально подобранных праймеров HK-NS1-226F (5'-ggattctgaaggaatccg) и PR8-NS1-523R (5'-tgacatcctcagcagtgtcc) («Syntol», Россия) и набора реагентов AmbionAgPath-ID One Step RT-PCR Kit («Thermo»). Длину ПЦР-фрагментов определяли методом электрофореза (ЭФ) в 1% агарозном геле при окрашивании бромистым этидием, детекцию проводили с помощью системы ChemiDoc («BioRad»). Секвенирование ПЦР-продуктов выполняли с помощью набора реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems») на капиллярном секвенаторе ABI GA3130 («Applied Biosystems»). Полученные последова-

<sup>1</sup> Приказ Минздрава СССР от 12.08.1977 N 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

<sup>2</sup> European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. ETSNo.123. Strasbourg, 18/03/1986.

тельности анализировали с использованием программы Vector NTI («Invitrogen»).

*Оценка экспрессии антигенов в зараженной культуре клеток MDCK.* Культуру клеток MDCK (#FR-58, получены из коллекции IRR) выращивали в среде DMEM («Биолот») с 5% эмбриональной сывороткой Sus («Биолот») и 1% GlutaMAX («Gibco») при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Суточный монослой клеток заражали вирусами в дозе 1—5 ТИД<sub>50</sub>/клетку и инкубировали при 34°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 6 ч.

Для постановки Вестерн-блот клетки (10<sup>6</sup>) снимали трипсином-ЭДТА («Sigma») и ресуспендировали в буфере Лэммли с β-меркаптоэтанолом («BioRad»). Затем проводили денатурирующий ЭФ образцов в 8—16% градиентном полиакриламидном геле (ПААГ), после чего белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («BioRad»). Мембрану блокировали 3% BSA («Amresco») в фосфатно-солевом буфере (PBS, «Amresco»), затем окрашивали антителами, разведенными 1:5000 в блокирующем буфере с добавлением 0,1% Tween-20 («Ferak Berlin»). Использовали мышиные моноклональные антитела 1H7 к NS1 (ФГБУ «НИИ гриппа») и ab26246 («Abcam») к ESAT-6. В качестве вторичных антител были использованы меченные пероксидазой хрена Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (G21040, «Invitrogen») в разведении 1:2000. Детекцию осуществляли с использованием Opti-4CN Substrate Kit («Bio Rad»).

Для иммуофлюоресцентного окрашивания клетки фиксировали 4% параформальдегидом («Sigma») и пермеабилizировали 0,2% Triton X-100 («Amresco») в PBS, затем блокировали 3% BSA в PBS в течение ночи. Антитела разводили в блокирующем буфере с добавлением 0,1% Tween-20. Окрашивание первичными антителами проводили в течение ночи при 4°C, вторичными флюоресцентно-мечеными антителами — в течение 1 ч при комнатной температуре. Использовали моноклональные мышиные антитела 1H7 к NS1 (1:200) и поликлональные кроличьи антитела ab45073 («Abcam») к ESAT-6 (1:1000), в качестве вторичных антител использовали флюоресцентно-меченные Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor® 488 (ab150077, «Abcam», 1:1000) и Goat Anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 488 (ab150113, «Abcam», 1:1000). Клетки фотографировали с использованием Cytell Cell Imaging System («GE Healthcare») с цифровым увеличением и увеличением объекта 10.

*Безопасность рекомбинантного штамма* изучали на мышах линии BALB/c. Мышей заражали интраназально в дозе 5,0 Ig ЭИД<sub>50</sub> по 30 мкл под легким эфирным наркозом (8 мышей на группу). Через 3 сут после заражения был осуществлен забор легких и носовых ходов у мышей (по 3 мыши на группу). Мониторинг массы тела и смертности животных (по 5 мышей на группу) был проведен в течение 14 дней после заражения. Органы гомогенизировали в 1 мл PBS с использованием TissueLyser («Qiagen») при 30 000 об/мин в течение 2 мин. Вирусную нагрузку определяли по результатам титрования суспензии органов в культуре клеток MDCK в присутствии ТРСК-трипсина (2,5 мкг/мл) и амфотерицина В (2,5 мкг/мл). Зараженные клетки инкубировали при 34°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 сут, результат оценивали в реакции гемагглютинации с 0,5% куриными эритроцитами, титр подсчитывали по методу Рида и Менча [14].

*Иммуногенность рекомбинантного штамма* изучали на мышах C57/black. Мышей (по 5 на группу) иммунизировали, как описано выше. Через 10 сут у мышей

выделяли спленоциты, отбирали 10<sup>6</sup> клеток в 100 мкл и стимулировали белком Ag85A («Novus Biologicals») в конечной концентрации 5 мкг/мл в присутствии костимулирующих антител к рецептору CD28 («BioLegend»). Планшеты с клетками инкубировали в течение 12 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, после чего в лунки добавляли брефельдин А («BD Biosciences»). Для детекции живых клеток проводили окрашивание с помощью Zombie Red Fixable Viability Kit («BioLegend»). Для выделения популяции иммунных клеток использовали TruStainFcX CD16/32 («BioLegend»). Популяции лимфоцитов дифференцировали, используя антитела к поверхностным маркерам CD8 — PE/Cy7, CD4—PerCp/Cy5.5 («BD Pharmingen»), CD45 — APC/Cy7 («BD Biosciences», США). Затем клетки фиксировали и пермеабилizировали с использованием набора реагентов Cytotfix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit with BD GoldgiStop («BD Biosciences»), после чего окрашивали на внутриклеточные цитокины с использованием антител ИФН-γ — FITS, ФНО-α — Brilliant Violet 421, ИЛ-2 — PE («BD Pharmingen»). Результаты окрашивания детектировали на проточном цитометре BD FACSCanto II («BD Biosciences») и анализировали в программе Kaluza Analiziz 1.05a.

*Статистический анализ данных* выполняли с помощью GraphPad Prizm 6.07, Microsoft Excel 2016 и RStudio Desktop 1.0.153. При выборе критерия руководствовались предположением о нормальности распределения случайной ошибки при работе с линейными животными.

## Результаты

### *Получение рекомбинантного штамма PR8/НК-NS80-E85A и его генетическая стабильность.*

На первом этапе была смоделирована последовательность гена NS холодоадаптированного вируса гриппа НК/162/35, кодирующая укороченный до 80 аминокислот белок NS1 с последующей вставкой антигенов ESAT-6 и Ag85A *M. tuberculosis*, разделённых сайтом протеолитического расщепления 2A. Последовательность модифицированного гена NS была синтезирована *de novo* и клонирована в двунаправленный вектор pHW2006. Затем методом обратной генетики был получен рекомбинантный вирус PR8/НК-NS80-E85A, содержащий *HA* и *NA* штамма PR8, гены внутренних и неструктурных белков вируса НК/162/35 и модифицированный ген NS со вставкой. Полученный вектор стабилизировали методом клонирования в предельных разведениях в РКЭ под контролем ОТ-ПЦР для определения размера гетерологичной вставки в различных вирусных клонах. Все полученные клоны характеризовались укороченной вставкой по сравнению с исходной. Нуклеотидные последовательности рекомбинантного гена NS клонов были определены методом секвенирования. Для дальнейшей работы был выбран клон, сохранивший наибольшую по размеру вставку без сдвига рамки считывания (рис. 1, а). Данный клон содержал антиген ESAT-6 и участок 199—261 антигена Ag85A и сохранял эту вставку при дальнейших пассажах в РКЭ (рис. 1, б).

*Рекомбинантный штамм A/PR8/НК-NS80-E85A характеризуется ts- и са-фенотипом и аттенуирован для мышей BALB/c.*

Маркерами аттенуации вирусов гриппа, используемых в качестве живых вакцин, являются ts- и са-фенотипы. Для определения фенотипа рекомбинантного вируса A/PR8/НК-NS80-E85A мы сравнили показатели его инфек-

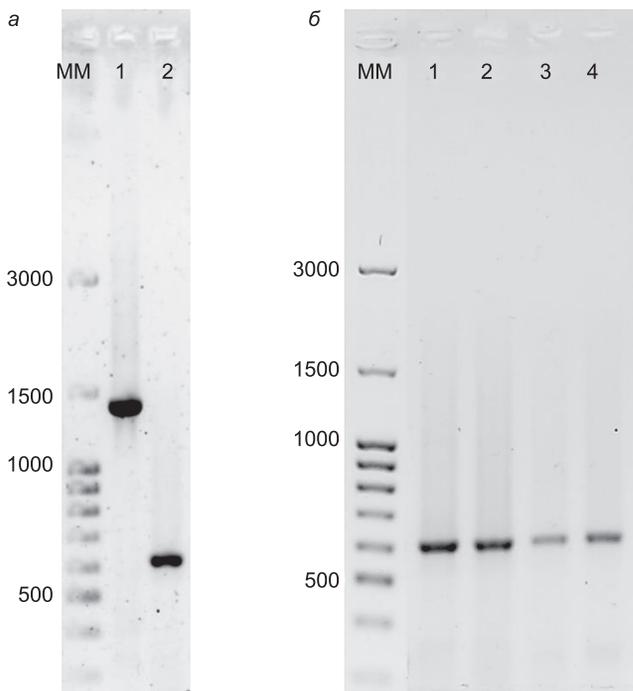


Рис. 1. Генетическая стабильность штамма А/PR8/НК-NS80-Е85А.

*a* — ПЦР-фрагменты гетерологичной вставки в гене *NS* в исходной плазмиде (дорожка 1) и гене *NS* штамма PR8/НК-NS80-Е85А (дорожка 2); *б* — ПЦР-фрагменты гетерологичной вставки в гене *NS* пассажных вариантов Е1—Е4 штамма PR8/НК-NS80-Е85А (дорожки 1—4 соответственно). MM — маркер молекулярной массы (п.н.)

ционной активности в РКЭ при различных температурах инкубации (см. таблицу). Разница в репродуктивной активности штамма при повышенной и оптимальной температурах  $RCT_{39}$  составила более 5 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл, разница в репродукции при пониженной и оптимальной температурах  $RCT_{26}$  была менее 3 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл, из чего можно заключить, что штамм А/PR8/НК-NS80-Е85А обладает ts- и са-фенотипом.

Аттенуацию штамма А/PR8/НК-NS80-Е85А оценивали при интраназальном заражении мышей BALB/c в дозе 5,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/мышь. В качестве контрольных вирусов использовали патогенный для мышей штамм PR8 и частично аттенуированный для мышей штамм А/PR8-NS124-ESAT6. Судя по динамике массы мышей (рис. 2, *a*), штамм А/PR8/НК-NS80-Е85А был полностью аттенуирован — мыши практически не теряли в массе после заражения в отличие от мышей, которым ввели вирус А/PR8-NS124-ESAT6, при этом мыши, зараженные патогенным штаммом PR8 в той же дозе, погибли к 8-м суткам после заражения.

Репродукцию вирусов в респираторном тракте мышей оценивали на 3-и сутки после заражения (рис. 2, *б*). Титр неаттенуированного штамма PR8 в лёгких мышей составлял  $5,42 \pm 0,38$  lg ТИД<sub>50</sub>/мл, что существенно превышало ( $p < 0,001$ ) вирусную нагрузку в лёгких мышей, заражённых частично аттенуированным вирусом А/PR8-NS124-ESAT6 ( $2,83 \pm 0,14$  lg ТИД<sub>50</sub>/мл) и полностью

аттенуированным штаммом А/PR8/НК-NS80-Е85А ( $1,67 \pm 0,29$  lg ТИД<sub>50</sub>/мл). При этом штамм А/PR8/НК-NS80-Е85А лучше размножался в носовых ходах мышей ( $0,58 \pm 0,14$  lg ТИД<sub>50</sub>/мл), чем в легких ( $p < 0,05$ ), что согласуется с его са-фенотипом.

При заражении культуры клеток MDCK рекомбинантным штаммом А/PR8/НК-NS80-Е85А происходит экспрессия туберкулёзного антигена ESAT-6.

Экспрессия гетерологичного антигена рекомбинантным векторным вакцинным штаммом обеспечивает его презентацию иммунной системе и выработку иммунного ответа нужного типа. Экспрессию антигена ESAT-6 и белка NS1 в цитоплазме клеток MDCK оценивали через 6 ч после их заражения рекомбинантным штаммом А/PR8/НК-NS80-Е85А и контрольными вирусами А/PR8/НК-6:2 RG и А/PR8-NS124-ESAT6. Иммунофлюоресцентное окрашивание клеток (рис. 3) демонстрировало активную экспрессию белка NS1 и антигена ESAT-6 в цитоплазме клеток, заражённых штаммом А/PR8/НК-NS80-Е85А и контрольным вирусом А/PR8-NS124-ESAT6. Результаты Вестер-блот-анализа (рис. 4) подтверждали экспрессию ESAT-6 и NS1, причём молекулярная масса белков совпадала с теоретически рассчитанной с использованием сервера ExPASy-ProtParam [15]. Расчетная масса белка NS1 (80 аминокислот) с двойной вставкой ESAT6-Ag85A<sub>199-261</sub> составляла 24 кДа, масса белка NS1 дикого типа — 25,9 кДа, масса белка NS1 (124 аминокислоты) со вставкой ESAT6 — 24,2 кДа.

Рекомбинантный штамм А/PR8/НК-NS80-Е85А стимулирует противотуберкулёзный Т-клеточный ответ при интраназальной иммунизации мышей C57/black.

Для оценки способности рекомбинантного штамма А/PR8/НК-NS80-Е85А индуцировать Th-1-Т-клеточный иммунный ответ мышей C57/black интраназально иммунизировали в дозе 5,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/мышь. Через 10 дней оценивали внутриклеточную продукцию цитокинов лимфоцитами селезёнки, стимулированными рекомбинантным антигеном Ag85А. В качестве контрольной группы использовали мышей, иммунизированных вирусом А/PR8/НК-NS80 без соответствующей вставки.

После однократной иммунизации рекомбинантным штаммом А/PR8/НК-NS80-Е85А доля цитокинпродуцирующих CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов в спленоцитах мышей при специфической стимуляции была достоверно выше, чем в контрольной группе животных ( $3,16 \pm 1,25$  против  $1,43 \pm 0,40$ ;  $p = 0,016$ , *t*-критерий Стьюдента; рис. 5, *a*).

Далее была изучена функциональная активность CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, способных под действием специфической стимуляции синтезировать ИФН-γ, ФНО-α и ИЛ-2 или различные комбинации данных цитокинов. Среди популяции антигенспецифических CD4<sup>+</sup>-Т-клеток селезёнки преобладали Т-клетки, секретирующие один цитокин (ИФН-γ (36,85% от общего числа цитокинпродуцирующих CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов), ФНО-α (31,77%) или ИЛ-2 (4,12%)). В то же время были обнаружены и полифункциональные антиген-

**Инфекционная активность штамма А/PR8/НК-NS80-Е85А в куриных эмбрионах при различной температуре**

Вирус	Инфекционная активность, lg ЭИД <sub>50</sub> /0,2 мл			RCT <sub>26</sub>	RCT <sub>39</sub>
	26°C	34°C	39°C		
А/PR8/НК-NS80-Е85А	3,48 ± 0,82	5,35 ± 0,84	0,06 ± 0,18	1,96 ± 0,52	5,32 ± 0,65

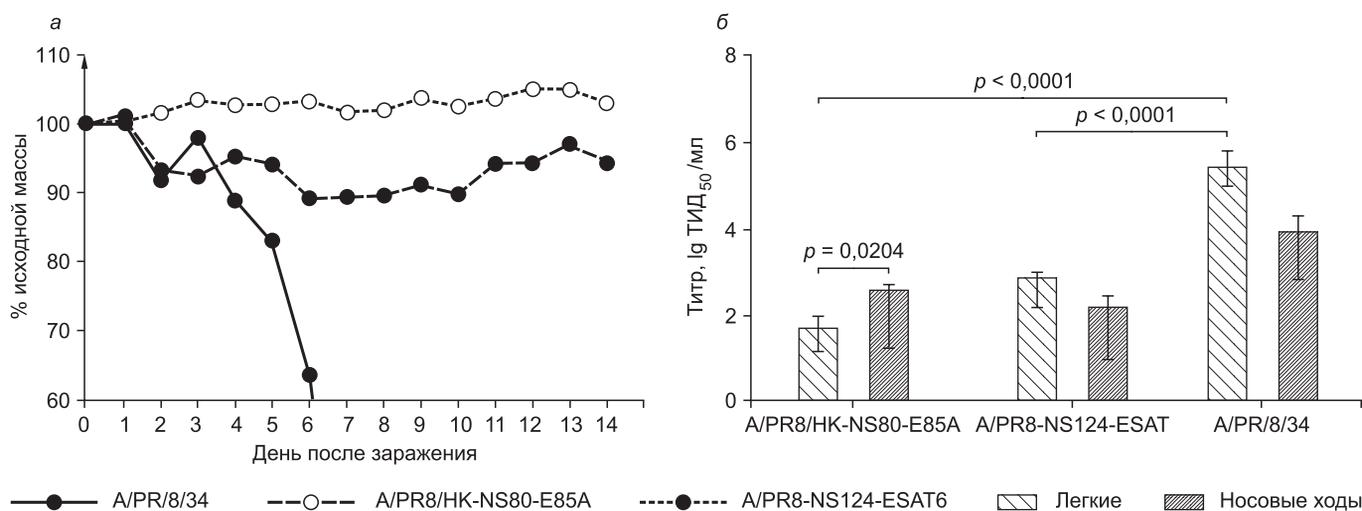


Рис. 2. Безопасность штамма A/PR8/HK-NS80-E85A для мышей.

*а* — график динамики массы мышей после заражения соответствующими вирусами. Потерю массы для каждого животного (в %) относительно исходного уровня (0-й день) определяли индивидуально, затем рассчитывали среднее по группе; *б* — вирусная нагрузка в респираторном тракте мышей после заражения соответствующими вирусами. Значение *p* определено по результатам многофакторного дисперсионного анализа с последующими попарными сравнениями по методу Тьюкки с поправкой на множественность сравнений.

специфические Т-клетки, продуцирующие 2 цитокина (ИФН- $\gamma$  и ИЛ-2 (2,77%); ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  (2,06%); ФНО- $\alpha$  и ИЛ-2 (16,32%)), а также минорная популяция тройных продуцентов, секретирующих ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$  и ИЛ-2 (6,10%)) (рис. 5, б).

### Обсуждение

В данном исследовании был сконструирован рекомбинантный штамм A/PR8/HK-NS80-E85A, содержащий поверхностные антигены HA и NA от вируса гриппа PR8, а внутренние белки, в том числе модифицированный белок

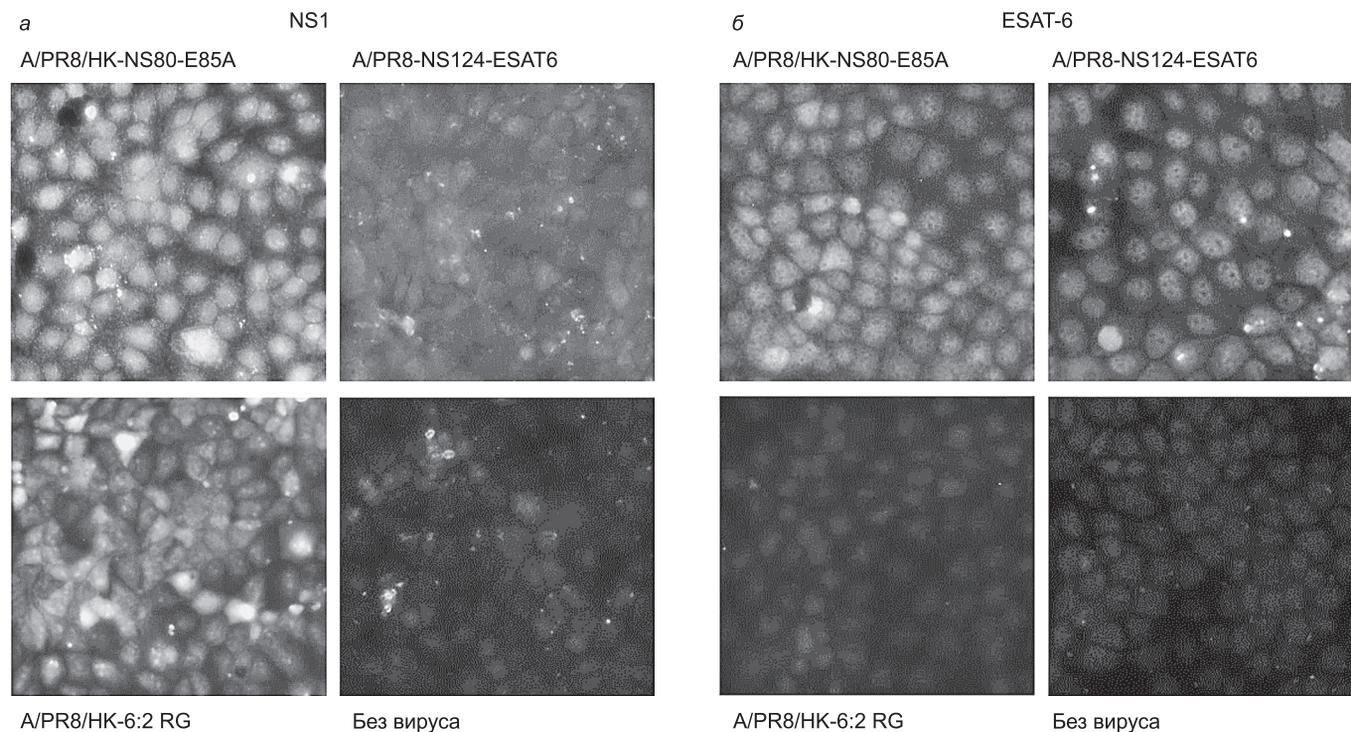


Рис. 3. Экспрессия белков ESAT6 и NS1 в клетках MDCK, заражённых вирусом A/PR8/HK-NS80-E85A.

Результаты иммунофлуоресцентного окрашивания клеток MDCK через 6 ч после заражения соответствующими вирусами. Для визуализации белка NS1 (*а*) и антигена ESAT-6 (*б*) использованы антитела, меченные зелёным флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488, изображение получено с использованием Cytell Cell Imaging System (GE).

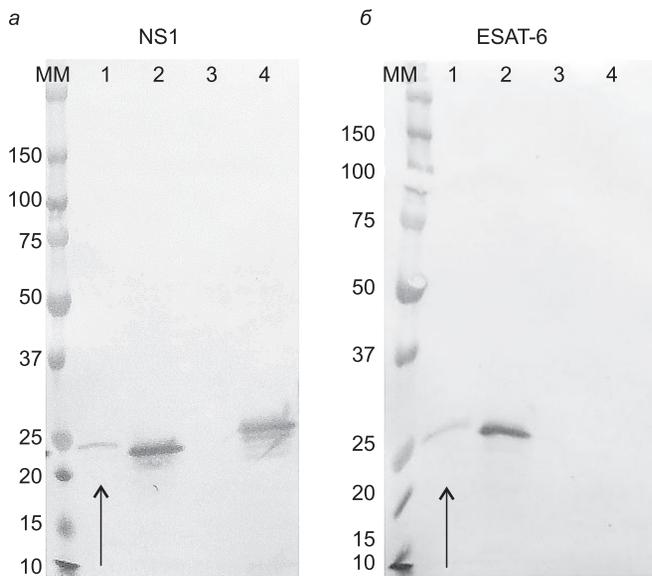


Рис. 4. Экспрессия белков ESAT6 и NS1 в клетках MDCK, заражённых вирусом A/PR8/НК-NS80-E85A.

Результаты ЭФ в ПААГ и Вестерн-блот-окрашивания антителами к NS1 (а) и ESAT-6 (б) лизатов клеток MDCK через 6 ч после заражения соответствующими вирусами. Дорожка 1 — клетки, заражённые вирусом A/PR8/НК-NS80-E85A, дорожка 2 — клетки, заражённые вирусом A/PR8-NS124-ESAT6, дорожка 3 — незаражённые клетки, дорожка 4 — клетки, заражённые вирусом A/PR8/НК-6:2 RG. MM — маркер молекулярной массы, кДа. Красная стрелка отмечает лизат клеток, заражённых вирусом A/PR8/НК-NS80-E85A.

NS1, — от са-штамма-донора НК/162/35. Белок NS1 рекомбинантного вируса был укорочен до 80 аминокислот, после которых содержал вставку туберкулёзных антигенов ESAT-6 и участка аминокислот 199—261 Ag85A в единой рамке считывания. Подобная конструкция возникла в результате делеции в модифицированном гене NS1, который изначально содержал полно-размерный Ag85A и сайт расщепления 2A после ESAT-6. Причиной возникновения делеции могли стать нарушения консервативной вторичной структуры в участке 495—564 генного сегмента NS, которая, вероятно, играет определенную роль в адаптации вируса гриппа к организму хозяина [16, 17]. Полученный делеционный вариант вируса при этом был генетически стабилен и сохранял вставку ESAT-6\_Ag85A<sup>[199-261]</sup> при пассировании в куриных эмбрионах.

Несмотря на модификацию гена NS и вставку гетерологичных антигенов, штамм A/PR8/НК-NS80-E85A унаследовал са- и ts-фенотип штамма-донора НК/162/35, на основе которого он был сконструирован. Эти данные дополняют уже опубликованные результаты относительно сохранения са-фенотипа гриппозного вектора при вставке гетерологичных антигенов в ген HA [18, 19].

Вирус A/PR8/НК-NS80-E85A был полностью аттенуирован для мышей,

поскольку не вызывал достоверных изменений их массы и не размножался в лёгких животных. При этом размножение вируса было отмечено в носовых ходах мышей, что характерно для са-реассортантных штаммов [20—22].

Нами была продемонстрирована способность гриппозного вектора A/PR8/НК-NS80-E85A индуцировать CD4<sup>+</sup>-Т-клеточный ответ Th-1-типа к антигену Ag85A у иммунизированных мышей линии C57/black при однократном интраназальном введении. При этом наибольшее число специфически стимулированных лимфоцитов вырабатывали ИФН-γ. Полученные результаты коррелируют с ранее опубликованными данными, где была также обнаружена большая доля CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, секретирующих ИФН-γ в ответ на интраназальное введение рекомбинантного гриппозного вектора [5]. Таким образом, несмотря на частичную делецию в рекомбинантном (химерном) гене NS, вектор A/PR8/НК-NS80-E85A содержит достаточное количество функциональных Т-клеточных эпитопов антигена Ag85A [23], необходимых для стимуляции иммунного ответа. Кроме того, обнаруженные полифункциональные Т-лимфоциты благодаря более выраженной эффекторной функции по сравнению с Т-клетками, секретирующими только один цитокин, могут рассматриваться в качестве потенциального иммунологического маркера протективного иммунитета при туберкулезе [24, 25].

### Заключение

В результате работы сконструирован рекомбинантный вирус PR8/НК-NS80-E85A на основе са-гриппозного вектора с укороченным белком NS1, содержащий вставку туберкулёзных антигенов ESAT-6 и Ag85A. Рекомбинантный штамм PR8/НК-NS80-E85A обладал са- и ts-фенотипом и был аттенуирован для мышей. Методами иммунофлюоресцентного окрашивания и Вестерн-блот показана экспрессия белка ESAT-6 при заражении реком-

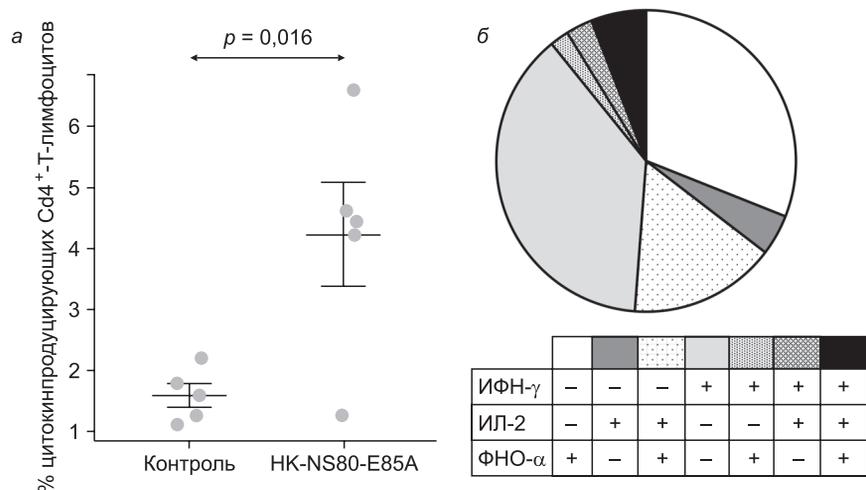


Рис. 5. Индукция Т-клеточного ответа при иммунизации мышей штаммом A/PR8/НК-NS80-E85A.

а — относительное содержание цитокинпродуцирующих CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов (в %) в спленотах мышей после интраназальной иммунизации рекомбинантным вирусом A/PR8/НК-NS80-E85A и контрольным вирусом без вставки A/PR8-NS124-ESAT6 (контроль). Значение *p* критерия дано по результатам *t*-теста Стьюдента (б) Доля антиген-специфических CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, продуцирующих ИФН-γ, ИЛ-2 и ФНО-α в различных сочетаниях после интраназальной иммунизации рекомбинантным вирусом A/PR8/НК-NS80-E85A.

бинантным вирусом PR8/НК-NS80-E85A клеток MDCK. При интраназальном введении мышам рекомбинантный вирус PR8/НК-NS80-E85A стимулировал специфический противотуберкулезный CD4<sup>+</sup>-Т-клеточный ответ Th1- типа с образованием полифункциональных антигенспецифических Т-клеток.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность ведущему лаборатории биотехнологий диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа» Е.А. Сорокину за предоставленные антитела 1Н7.

**Финансирование.** Работа поддержана грантом «УМНИК» Фонда содействия развитию № 7934ГУ/2015 и премией Правительства Санкт-Петербурга победителя конкурса грантов 2016 г. для студентов вузов, расположенных на территории Санкт-Петербурга.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—3, 5, 6, 8—11, 14—16, 18, 20, 21, 23—25 см. REFERENCES)

- Стукова М.А., Зabolotnykh N.V., Vinogradova T.I., Gergert V.Ya., Apt A.S., Kaprel'yants A.S. и др. Профилактика туберкулеза: современные подходы к разработке противотуберкулезных вакцин. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012; (11): 45—52.
- Заболотных Н.В., Шурыгина А.-П.С., Виноградова Т.И., Витовская М.Л., Хайруллин Б.М., Сандыбаев Н.Т. и др. Усиление протективного эффекта вакцины БЦЖ при мукозальной бустиммунизации гриппозным вектором, экспрессирующим микобактериальные белки ESAT-6 и Ag85A. *Биофармацевтический журнал*. 2016; 8(6): 25—31.
- Цыбалова Л.М., Горев Н.Е., Потапчук М.В., Репко И.А., Коротков А.В., Сергеева М.В. и др. Характеристика холодадаптированного штамма вируса гриппа А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2) как потенциального донора аттенуации и высокой репродуктивности. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(6): 13—7.
- Пулькина А.А., Сергеева М.В., Петров С.В., Фадеев А.В., Комиссаров А.Б., Романовская-Романько Е.А. и др. Влияние мутаций в нуклеопротеине на репликацию реассортантов вируса гриппа А/Гонконг/1/68/162/35 при различных температурах. *Молекулярная биология*. 2017; 51(2): 378—83.
- Пулькина А.А., Сергеева М.В., Синцова К.С., Комиссаров А.Б. Влияние особенностей структуры РНК на генетическую стабильность вставки туберкулезных антигенов в гриппозном векторе. В кн.: *Неделя науки СПбГУ. Материалы научной конференции с международным участием*. СПб.; 2016: 492—5.
- Третьак Т.С., Исакова-Сивак И.Н., Кореньков Д.А., Смолоногина Т.А., Руденко Л.Г. Анализ ростовых характеристик векторных вакцин против респираторно-синцитиального вируса. *Медицинский академический журнал*. 2016; 16(4): 171—2.
- Дешева Ю.А., Лу Х., Рекстин А.Р., Кац М.Д., Руденко Л.Г., Климов А.И. Прививочные свойства реассортантного холодадаптированного штамма вируса гриппа А(H5N2) при интраназальном введении мышам. *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(4): 27—30.
- Zabolotnykh N.V., Shurygina A.-P.S., Vinogradova T.I., Vitovskaya M.L., Khayrullin B.M., Sandybaev N.T., et al. Mucosal immunization with influenza vector expressing ESAT-6 and Ag85A antigens of *M. tuberculosis* enhances protective effect of BCG vaccine. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal*. 2016; 8(6): 25—31. (in Russian)
- Flórido M., Pillay R., Gillis C.M., Xia Y., Turner S.J., Triccas J.A., et al. Epitope-specific CD4<sup>+</sup>, but not CD8<sup>+</sup>, T-cell responses induced by recombinant influenza A viruses protect against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur. J. Immunol.* 2015; 45(3): 780—93.
- Ferko B., Stasakova J., Sereinig S., Romanova J., Katinger D., Niebler B., et al. Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice. *J. Virol.* 2001; 75(19): 8899—908.
- Kittel C., Ferko B., Kurz M., Voglauer R., Sereinig S., Romanova J., et al. Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment. *J. Virol.* 2005; 79(16): 10672—7.
- Egorov A., Brandt S., Sereinig S., Romanova J., Ferko B., Katinger D., et al. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J. Virol.* 1998; 72(8): 6437—41.
- Tsybalova L.M., Gorev N.E., Potapchuk M.V., Repko I.A., Korotkov A.V., Sergeeva M.V., et al. Characterization of Cold-adapted Influenza Strain A/Hong Kong/1/68/162/35 as a Potential Donor of Attenuation and High Reproduction. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(6): 13—7. (in Russian)
- Pul'kina A.A., Sergeeva M.V., Petrov S.V., Fadeev A.V., Komissarov A.B., Romanovskaya-Roman'ko E.A., et al. Impact of mutations in nucleoprotein on replication of influenza virus A/Hong Kong/1/68/162/35 reassortants at different temperatures. *Molekul'yarnaya biologiya*. 2017; 51(2): 378—83. (in Russian)
- Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938; 27: 493—7.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker J.M., ed. *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press; 2005: 571—607.
- Vasin A.V., Petrova A.V., Egorov V.V., Plotnikova M.A., Klotchenco S.A., Karpenko M.N., et al. The influenza A virus NS genome segment displays lineage-specific patterns in predicted RNA secondary structure. *BMC Res. Notes*. 2016; (9): 279.
- Pul'kina A.A., Sergeeva M.V., Sintsova K.S., Komissarov A.B. Influence of RNA structure peculiarities on genetic stability of insertion of tuberculosis antigens in the influenza vector. In: *SPbSTU Week of Science. Proceedings of the Scientific Conference with International Participation [Nedelya nauki SPbPU. Materialy nauchnoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem]*. St. Petersburg; 2016: 492—5. (in Russian)
- Isakova-Sivak I., Tretiak T., Rudenko L. Cold-adapted influenza viruses as a promising platform for viral-vector vaccines. *Expert. Rev. Vaccines*. 2016; 15(10): 1241—3.
- Tretiak T.S., Isakova-Sivak I.N., Koren'kov D.A., Smolonogina T.A., Rudenko L.G. Analysis of the growth characteristics of vector vaccines against the respiratory syncytial virus. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal*. 2016; 16(4): 171—2. (in Russian)
- Romanov J.R., Ermachenko T.A., Alexandrova G.I., Tannock G.A. Interference between cold-adapted (ca) influenza A and B vaccine reassortants or between ca reassortants and wild-type strains in eggs and mice. *Vaccine*. 1994; 12(1): 23—7.
- Chen H., Matsuoka Y., Swayne D., Chen Q., Cox N.J., Murphy B.R., et al. Generation and characterization of a cold-adapted influenza A H9N2 reassortant as a live pandemic influenza virus vaccine candidate. *Vaccine*. 2003; 21(27-30): 4430—6.
- Desheva Yu.A., Lu Kh., Rekstin A.R., Kats M.D., Rudenko L.G., Klimov A.I. The inoculative properties of cold-adapted reassortant A(H5N2) influenza strain during intranasal administration to mice. *Voprosy virusologii*. 2007; 52(4): 27—30. (in Russian)
- Huygen K. The Immunodominant T-Cell Epitopes of the Mycolyl-Transferases of the Antigen 85 Complex of *M. tuberculosis*. *Front. Immunol.* 2014; (5): 321.
- Thakur A., Pedersen L.E., Jungersen G. Immune markers and correlates of protection for vaccine induced immune responses. *Vaccine*. 2012; 30(33): 4907—20.
- Dietrich J., Aagaard C., Leah R., Olsen A.W., Stryhn A., Doherty T.M., et al. Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. *J. Immunol.* 2005; 174(10): 6332—9.

#### REFERENCES

- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. Available at: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
- World Health Organization. BCG vaccine. WHO position paper. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2004; 79(4): 27—38.
- Ottenhoff T.H., Kaufmann S.H. Vaccines against Tuberculosis: Where Are We and Where Do We Need to Go? *PLoS Pathog.* 2012; 8(5): e1002607.
- Stukova M.A., Zabolotnykh N.V., Vinogradova T.I., Gergert V.Ya., Apt A.S., Kaprel'yants A.S. Prevention of tuberculosis: current approaches to development of vaccines. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2012; (11): 45—52. (in Russian)
- Stukova M.A., Sereinig S., Zabolotnykh N.V., Ferko B., Kittel C., Romanova J., et al. Vaccine potential of influenza vectors expressing *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 protein. *Tuberculosis*. 2006; 86(3-4): 236—46.
- Kuznetsova I., Shurygina A.P., Wolf B., Wolschek M., Enzmann F., Sansyzbay A., et al. Adaptive mutation in nuclear export protein allows stable transgene expression in a chimeric influenza A virus vector. *J. Gen. Virol.* 2014; 95(Pt. 2): 337—497.