

УДК 571.27; 579

Индукция иммунного ответа к *Bacillus anthracis* при интраназальном введении рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего протективный антиген, слитый с Fc-фрагментом антитела IgG2a

Д. Н. Щербинин¹, И. Б. Есмагамбетов¹, А. Н. Носков¹, Ю. О. Селянинов², И. Л. Тутыхина¹, М. М. Шмаров¹, Д. Ю. Логунов¹, Б. С. Народицкий¹, А. Л. Гинцбург¹

¹Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

²Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии РАСХН, 601120, Покров Петушинского р-на Владимирской обл.

*E-mail: dim284@inbox.ru

Поступила в редакцию 13.08.2013

РЕФЕРАТ Сибирская язва – особо опасное инфекционное заболевание человека и сельскохозяйственных животных, протекающее в кожной или септической форме и характеризующееся интоксикацией, развитием серозно-геморрагического воспаления кожи, лимфатических узлов и внутренних органов. Возбудитель сибирской язвы – грамположительная капсулообразующая аэробная палочка *Bacillus anthracis*. Для предотвращения заболеваний людей сибирской язвой необходимы эффективные вакцинные препараты, способные быстро индуцировать стойкий иммунный ответ. В данной работе сконструированы три рекомбинантных аденовируса человека серотипа 5, содержащих различные модификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих четвертый домен протективного антигена (РА). Все три модификации протективного антигена – секретлируемый (Ad-sPA), несекретлируемый (Ad-cPA) и протективный антиген, соединенный с Fc-фрагментом иммуноглобулина IgG2a (Ad-PA-Fc), обладали защитными свойствами против *B. anthracis*. Наиболее высокий уровень протекции, выразившийся в способности защищать мышей от гибели после заражения летальной дозой *B. anthracis*, индуцировал рекомбинантный аденовирус Ad-PA-Fc. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что добавление к протективному антигену Fc-фрагмента антитела значительно увеличивает способность рекомбинантного аденовируса Ad-PA-Fc, содержащего данный ген, защищать от *B. anthracis*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Bacillus anthracis*, иммунизация, протективный антиген, рекомбинантные аденовирусы.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Ad – аденовирус; БОЕ – бляшкообразующая единица; РА – протективный антиген; Fc – Fc-фрагмент иммуноглобулина IgG2a; IFA – неполный адъювант Фрейнда; PBS – фосфатно-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Bacillus anthracis – грамположительная капсулообразующая аэробная палочка, вызывающая опасное инфекционное заболевание, поражающее восприимчивых животных и людей. Ежегодно во многих странах мира регистрируются случаи заболевания людей сибирской язвой. Попавшие в организм споры возбудителя сибирской язвы фагоцитируются макрофагами, которые затем мигрируют в региональ-

ные лимфоузлы [1]. В макрофагах споры переходят в вегетативную форму, что приводит к развитию системной инфекции. Из-за наличия у *B. anthracis* комплекса факторов патогенности сибирская язва нередко протекает в острой форме с высоким уровнем летальных исходов, если не приняты своевременные лечебно-профилактические мероприятия [2–5].

Проблема профилактики сибирской язвы остается актуальной и в настоящее время в связи с еже-

годными спорадическими вспышками болезни среди людей, в том числе со смертельными исходами [6, 7]. С целью специфической профилактики сибирской язвы на территории России используют вакцину на основе бескапсульного штамма СТИ-1. Однако живая вакцина СТИ-1 имеет ряд недостатков, включая необходимость ежегодной ревакцинации, реактогенность для отдельных индивидов, отсутствие напряженного иммунитета против некоторых полевых изолятов, циркулирующих на территории РФ [8–12]. Применяемая в США химическая вакцина также далеко не совершенна – для создания напряженного иммунитета ее нужно вводить шестикратно в течение 18 месяцев, что вызывает алергизацию ревакцинируемого организма. С учетом этого задача совершенствования противосибиреязвенных вакцин остается актуальной для медицинской и ветеринарной практики, поэтому ведется постоянный поиск новых средств специфической профилактики сибирской язвы.

Одна из первых попыток использования аденовирусных векторов для иммунизации лабораторных животных против *B. anthracis* была предпринята группой исследователей из США под руководством М.Дж. McConnell [13]. Эти ученые добились экспрессии секреторируемой формы четвертого домена протективного антигена с использованием рекомбинантного аденовирусного вектора и показали, что однократная иммунизация экспериментальных животных с последующим введением летальной дозы сибиреязвенного токсина обеспечивает 67% защиту мышей линии Balb/c. Эти первые данные показали, что аденовирусные векторы, несущие гены основных протективных антигенных детерминант, имеют хорошие перспективы использования для иммунизации против сибирской язвы.

Нами сконструированы рекомбинантные аденовирусы, способные индуцировать выработку специфического иммунного ответа против *B. anthracis*. Конструкция содержала вставку, кодирующую химерный белок, состоящий из четвертого домена протективного антигена (РА) и Fc-фрагмента иммуноглобулина IgG2a. Методами генной инженерии в качестве контроля были подготовлены два рекомбинантных аденовируса, несущих секреторируемую и несекреторируемую формы четвертого домена протективного антигена. Все три варианта обладали иммуногенными и протективными свойствами, индуцируя синтез специфических антител против *B. anthracis*. Однако рекомбинантный аденовирус, содержащий вставку, кодирующую химерный белок (Ad-РА-Fc), проявил наиболее сильную степень защиты по сравнению с контрольными аденовирусами Ad-sРА и Ad-cРА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Конструкция рекомбинантных аденовирусов

С использованием *in silico*-анализа проведена оптимизация кодонов в гене протективного антигена. Кодоны в гене РА-Fc были адаптированы к экспрессии в клетках *Mus musculus*, при этом использовали два наиболее часто встречающихся аминокислотных триплета. Наиболее часто встречающиеся кодоны *M. musculus* были определены согласно базе данных <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. Модифицированная нуклеотидная последовательность, кодирующая четвертый домен РА, связанный с Fc-фрагментом антитела, синтезирована компанией ЗАО «Евроген» и доставлена нам в составе плазмиды pAtlas-РА-Fc.

Фрагмент РА-Fc был субклонирован по NotI- и HindIII-сайтам в челночный вектор pShuttle-CMV для получения челночной плазмиды pShuttle-CMV-РА-Fc. Затем из плазмиды pShuttle-CMV-РА-Fc путем рестрикции и последующего лигирования получены челночные плазмиды pShuttle-sРА и pShuttle-CMV-cРА. pShuttle-CMV-sРА получили путем расщепления плазмиды pShuttle-CMV-РА-Fc рестриктазой XhoI с последующим лигированием липких концов. Соответствующий C-концевой XhoI-сайт рестрикции располагался в последовательности ТААСТСГAGТAAAAGСТТ таким образом, что после удаления Fc-фрагмента образуется новый стоп-кодон. pShuttle-cРА получен из плазмиды pShuttle-CMV-sРА путем удаления участка, содержащего лидерный пептид tra рестриктазами NotI и NdeI.

Для получения рекомбинантных аденовирусов Ad-РА-Fc, Ad-cРА и Ad-sРА методом гомологичной рекомбинации в клетках *Escherichia coli* использовали систему AdEasy Adenoviral Vector System (Stratagene). С этой целью плазмиды pShuttle-CMV-РА-Fc, pShuttle-CMV-cРА и pShuttle-CMV-sРА линейаризовали ферментом PmeI, смешивали с конструкцией pAd-Easy и котрансформировали в клетки *E. coli* (штамм ВJ5183). Из полученных рекомбинантных клонов выделяли плазмидные ДНК и определяли их молекулярные массы. Плазмидами размером более 20 т.п.н. трансформировали клетки *E. coli* штамма DH5alpha, в котором, в отличие от штамма ВJ5183, возможна препаративная наработка рекомбинантных плазмид. Очищенные плазмидные клоны анализировали, расщепляя рестриктазой HindIII, а также методом ПЦР.

На следующем этапе изучали инфекционность описанных плазмид для перmissive клеток. Клетки линии 293 трансфицировали плазмидами pAd-РА-Fc, pAd-sРА и pAd-cРА, линейаризованными по PacI-сайтам. Трансфекцию проводили в 24-луночной планшете с использованием реактива

Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Через 10 дней после трансфекции клетки собирали, замораживали–оттаивали, полученным лизатом, содержащим рекомбинантные аденовирусы, заражали клетки линии 293 в 35-мм чашке. Через 5 дней наблюдали специфический лизис клеток, обусловленный цитопатическим действием рекомбинантных аденовирусов. Из лизата клеток выделяли ДНК и анализировали методом ПЦР. В лизате клеток выявлена ДНК рекомбинантного аденовируса человека серотипа 5, несущего вставки, кодирующие протективный антиген.

Накопление вирусов

Рекомбинантные аденовирусы человека серотипа 5 накапливали в культуре клеток линии 293. Монослой клеток с конфлюэнтностью 50–70% заражали лизатом клеток 293, зараженных рекомбинантными Ad, в дозе 10^7 БОЕ на 15-см чашку. Через 2 сут инфицированные клетки снимали, концентрировали низкоскоростным центрифугированием, суспендировали в буфере (0.01 М Трис-НСl pH 8.0, 0.01 М NaCl, 5 мМ EDTA) и разрушали с помощью трехкратного замораживания–оттаивания. Полученную суспензию центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин при +4°C, осадок удаляли. Рекомбинантные аденовирусы, находящиеся в надосадочной жидкости, очищали ультрацентрифугированием в градиенте плотности хлорида цезия. В результате были получены три рекомбинантных аденовируса человека серотипа 5, несущие различные вставки: Ad-sPA, Ad-sPA и Ad-PA-Fc. Титры препаратов рекомбинантных аденовирусов определяли методом бляшкообразования на культуре клеток HEK-293.

Экспрессия рекомбинантных белков из аденовирусного вектора

Экспрессию трех рекомбинантных белков, в состав которых входит антиген PA *B. anthracis*, определяли методом вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител против протективного антигена. В качестве положительного контроля использовали препарат протективного антигена, приобретенный в фирме Calbiochem (кат. номер 176908-100UG). Для этого рекомбинантными аденовирусами трансдуцировали клетки линии A549, через 2 сут определяли экспрессию протективного антигена в надосадочной жидкости и лизированном клеточном осадке. Fc-домен антитела в составе слитого белка оценивали методом вестерн-блоттинга с использованием меченных пероксидазой хрена антивидовых антител к IgG мышей (Amersham).

Продукция протективного антигена в *E. coli*

Плазмиду, несущую ген рецепторного домена, конструировали на основе коммерческих векторов

pUC19 и pET28b (Novagen). В качестве матрицы использовали суммарную ДНК, выделенную из штамма *B. anthracis* 71/1. Клонирование проводили по сайтам NdeI и EcoRI. При клонировании были использованы следующие праймеры (5'-3'): для PAGR4: прямой – GAGATCATATGGTTGGGGCGGATGAG и обратный – ATCTCGAATTCTTATCSTATSTCATAGCC. ПЦР-фрагменты выделяли с помощью наборов (GE, Inc.) согласно прилагаемой инструкции. Фрагменты, полученные после рестрикции NdeI и EcoRI (Fermentas), клонировали в вектор pUC19 (реципиент *E. coli* JM109), а затем в вектор pET28b. Для выделения рекомбинантных белков клетки *E. coli* BL21 трансформировали сконструированными векторами. Бактериальные культуры культивировали на LB-бульоне до поглощения $A_{600} = 0.6-0.8$, после чего добавляли IPTG (Sigma) до концентрации 10 мМ и культивировали в течение еще 3.5–4 ч. Бактериальную массу концентрировали центрифугированием в течение 15 мин при 8000 g, и бактериальные клетки ресуспендировали в PBS. Затем клетки разрушали ультразвуком (3 раза по 30 с на дезинтеграторе MSE (England)) и выделяли тельца включения двойным центрифугированием по 40 мин при 20000 g. Полученный осадок телец включения растворяли в 8 М растворе мочевины, а рекомбинантные белки выделяли согласно инструкции, прилагаемой к Ni-NTA-сефарозе (Invitrogen) с применением тромбина (Sigma).

Иммуногенность

Иммуногенность рекомбинантных аденовирусов, кодирующих антигены *B. anthracis*, оценивали на мышинной модели. Мышей линии Balb/c иммунизировали рекомбинантными аденовирусами дважды с интервалом в 2 недели. В качестве положительного контроля был использован полноценный белок протективного антигена, смешанный с неполным адьювантом Фрейнда, который вводили подкожно. Отрицательным контролем служил рекомбинантный аденовирус, не содержащий антигена (Ad-null). Иммунизацию рекомбинантными аденовирусами проводили интраназально, в дозе 4.6×10^9 БОЕ/мышь, в объеме 100 мкл. Через 2 недели после второй иммунизации брали пробы крови, из нее получали сыворотку, в которой в дальнейшем определяли наличие специфических антител.

Иммунизация

Экспериментальных животных иммунизировали интраназально рекомбинантными аденовирусными векторами в дозе 15×10^9 БОЕ/мышь. Протективный антиген с адьювантом Фрейнда вводили подкожно в дозе 8–10 мкг.

Экспериментальные животные

В работе были использованы самки мышей линии Balb/c массой 20 г.

Заражение животных

Для оценки протективных свойств потенциальных генетических вакцин иммунизированных животных заражали путем интраперитонеальной инокуляции заражающей тест-культуры в дозе 4 LD₅₀. В качестве заражающей культуры использовали бескапсульный штамм *Sterne B. anthracis*. Наблюдение за животными опытных и контрольных групп проводили в течение 10 сут после заражения. Все эксперименты с животными проводили в институте ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0. Результаты сравнения экспериментальных и контрольных групп считали статистически достоверными при $p < 0.05$. Результаты по выживаемости оценивались с применением критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Конструирование рекомбинантных аденовирусов

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности четвертого домена антигена PA получены из UniProtKB/Swiss-Prot P13423 и GenBank M22589.1. Анализ кодонов PA *B. anthracis* показал, что многие кодоны не оптимальны для экспрессии в клетках млекопитающих. Наиболее часто встречающиеся кодоны *B. anthracis* и *M. musculus* были определены согласно базе данных используемых кодонов <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. С целью обеспечения высокого уровня продукции белка кодоны были оптимизированы для трансляции в клетках *M. musculus*. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности Fc-фрагмента IgG2a получены из UniProtKB/Swiss-Prot P01863 и GenBank V00798.1. Между PA-антигеном и Fc-фрагментом антитела был встроен 12-членный глицин-сериновый спейсер (*рис. 1*). Три челночных вектора были сконструированы на основе одной плазмиды pShuttle-CMV-PA-Fc, из которой последовательно удаляли отдельные фрагменты.

Характеристика *in vitro* Ad-cPA, Ad-sPA и Ad-PA-Fc

Чтобы получить данные об экспрессии и секреции PA в составе рекомбинантного аденовируса, клетки A549 были трансдуцированы тремя аденовирусными конструкциями. В качестве положительного контроля мы использовали четвертый домен про-

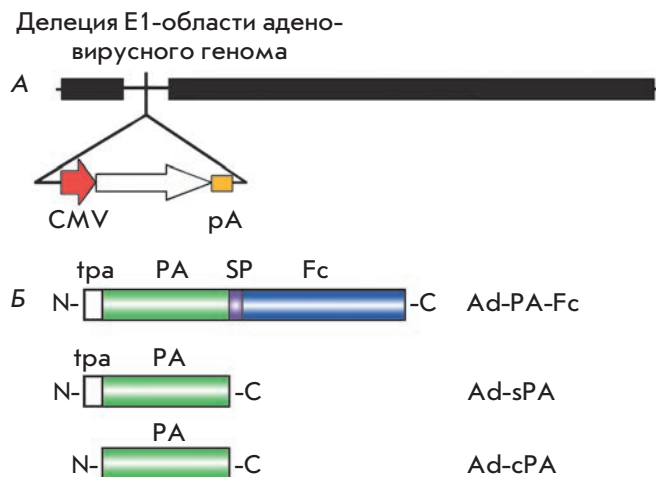


Рис. 1. Схема геномов рекомбинантных аденовирусов, несущих протективный антиген *B. anthracis*. А – геном рекомбинантного аденовируса человека серотипа 5. На месте делеции E1 области аденовирусного генома вставлена экспрессионная кассета. CMV – промотор цитомегаловируса; pA – сигнал полиаденилирования. Б – схемы строения антигенов. tpa – сигнальный пептид активатора плазминогена тканевого типа, PA – протективный антиген, SP – глицин-сериновый спейсер, Fc – Fc-фрагмент антитела IgG2a

тективного антигена, продуцируемый в *E. coli*. После инкубации в течение 48 ч в надосадочной жидкости от инфицированных клеток и в клеточном осадке методом иммуноблотинга анализировали присутствие четвертого домена протективного антигена (*рис. 2*). Надосадочная жидкость от клеток, трансдуцированных рекомбинантными аденовирусами Ad-sPA и Ad-PA-Fc (дорожки 3, 4), а также лизированные клетки, трансдуцированные рекомбинантным аденовирусом Ad-cPA (дорожка 2), содержали четвертый домен протективного антигена. Положительный результат получен и при определении очищенного четвертого домена протективного антигена, синтезированного в *E. coli* (дорожка 1).

Характеристика иммунного ответа, индуцируемого рекомбинантными аденовирусами Ad-cPA, Ad-sPA и Ad-PA-Fc, *in vivo*

Иммунный ответ на четвертый домен протективного антигена, экспрессируемого в составе рекомбинантных аденовирусов, оценивали на мышах линии Balb/c. Мышей двукратно иммунизировали с интервалом 2 недели. Спустя 10 дней после второй иммунизации у мышей отбирали кровь и методом ИФА в сыворотке выявляли специфические антитела к PA (*рис. 3*). Сыворотка крови мышей, инфицированных

рекомбинантным аденовирусом Ad-cPA, неожиданно для нас содержала специфические антитела в наибольшей концентрации, сходной с концентрацией у мышей, иммунизированных непосредственно РА с неполным адъювантом Фрейнда. Сыворотки крови мышей, инфицированных рекомбинантными аденовирусами Ad-sPA и Ad-PA-Fc, содержали специфические антитела к РА в меньшей концентрации, но уровень их был примерно одинаковым.

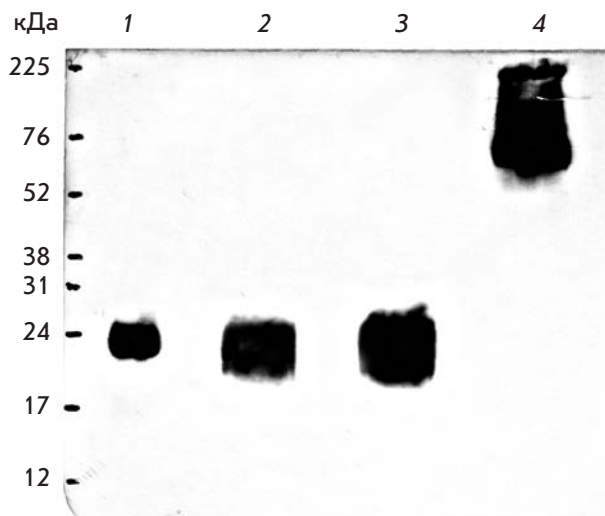


Рис. 2. Результаты выявления РА методом вестерн-блоттинга. 1 – очищенный четвертый домен рецепторного антигена, продуцируемый в клетках *E. coli*; 2 – лизат клеток, инфицированных Ad-cPA; 3 – супернатант от Ad-sPA-трансдуцированных клеток; 4 – супернатант от Ad-PA-Fc-трансдуцированных клеток

Определение подклассов специфических иммуноглобулинов IgG

В сыворотках, полученных в предыдущем опыте, определяли присутствие подклассов специфических иммуноглобулинов (IgG) к РА-антигену (рис. 4). Показано, что все рекомбинантные аденовирусы индуцируют выработку высоких уровней IgG2a и IgG1 (рис. 4А,Б). В сыворотках крови мышей, иммунизированных Ad-cPA и Ad-Fc-РА, также присутствуют антитела подкласса IgG2b (рис. 4Г). IgG3 не обнаружены в сыворотках крови животных ни одной из групп, включая положительный контроль (рис. 4В). Интересно, что иммунизация РА с неполным адъювантом Фрейнда не индуцировала синтез IgG2a, но вызывала синтез иммуноглобулинов подклассов IgG2b и IgG1.

Проверка защитных свойств рекомбинантных аденовирусов методом контрольного заражения

Для оценки протективной активности гуморального иммунного ответа, индуцируемого сконструированными рекомбинантными аденовирусами, иммунизированных мышей заражали летальной дозой *B. anthracis* штамм *Sterne* (4 LD₅₀). В течение 1 недели после заражения пали 80% животных контрольной группы, вакцинированных рекомбинантным аденовирусом без вставки (Ad-null). Все генетические конструкции, содержащие РА, обеспечили защиту животных от заражения *B. anthracis* на уровне 80–90% (табл. 1).

Предварительную оценку продолжительности сохранения напряженного противосибиреязвенного иммунитета проводили по следующей схеме (рис. 5). С интервалом в 2 недели мышей линии Balb/c иммунизировали рекомбинантными аденовирусами в дозе

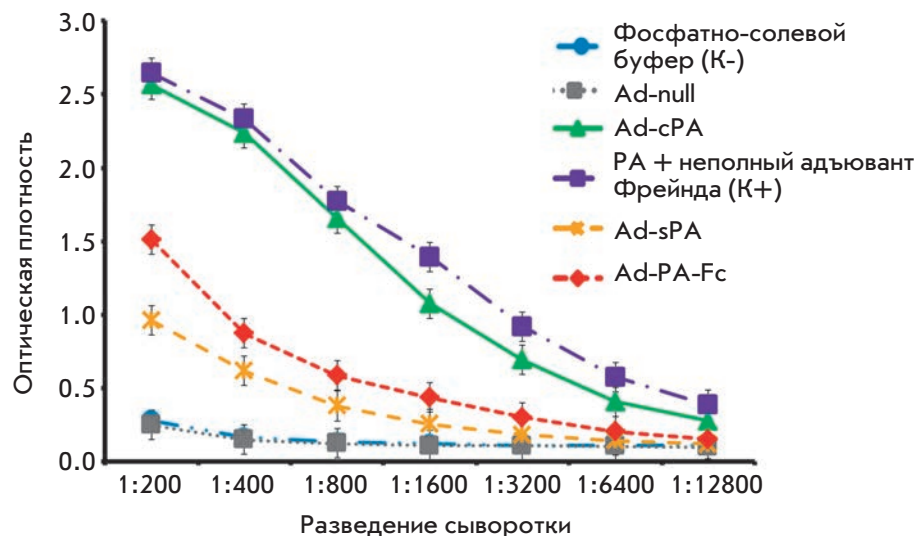


Рис. 3. Результаты выявления антител к РА в сыворотках крови мышей, иммунизированных рекомбинантными аденовирусами, методом ИФА. Ad-PA-Fc – рекомбинантный аденовирус, содержащий РА, слитый с Fc-фрагментом иммуноглобулина IgG2a; Ad-cPA – рекомбинантный аденовирус, содержащий несекретируемую форму РА; Ad-sPA – рекомбинантный аденовирус, содержащий секретируемую форму РА. Положительный контроль – белок РА, смешанный с неполным адъювантом Фрейнда. Отрицательный контроль – фосфатно-солевой буфер (PBS)

Таблица 1. Протективное действие генетических вакцин на основе рекомбинантных аденовирусов на модели инbredных белых мышей линии Balb/c

Группа животных	Иммунизирующий препарат	Мыши Balb/c	Выжило	Пало	Защита, %
1	РА + IFA	10	3	7	30
2	Ad-PA-Fc	10	9	1	90
3	Ad-cPA	10	8	2	80
4	Ad-sPA	10	8	2	80
5	Ad-null	10	2	8	20

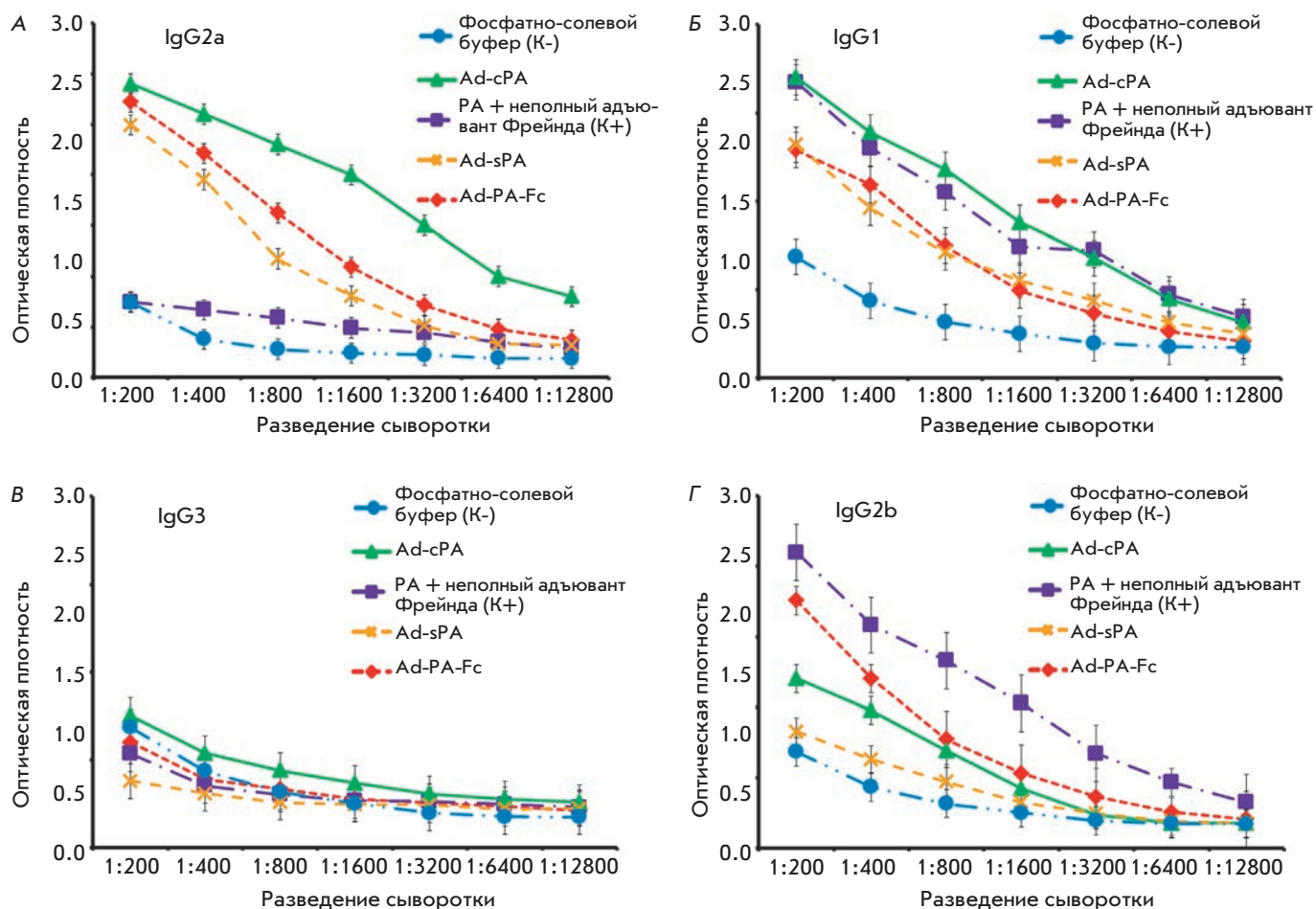


Рис. 4. Результаты выявления методом ИФА подклассов специфических IgG к РА в сыворотках крови мышей, иммунизированных рекомбинантными аденовирусами Ad-cPA, Ad-sPA и Ad-Fc-PA. А – количество специфических к РА иммуноглобулинов класса IgG2a; Б – IgG1; В – IgG3; Г – IgG2b. Ad-PA-Fc – рекомбинантный аденовирус, содержащий РА, слитый с Fc-фрагментом иммуноглобулина IgG2a; Ad-cPA – рекомбинантный аденовирус, содержащий несекретируемую форму РА; Ad-sPA – рекомбинантный аденовирус, содержащий секретируемую форму РА. Положительный контроль – белок РА, смешанный с неполным адьювантом Фрейнда. Отрицательный контроль – фосфатно-солевой буфер (PBS)

4.6×10^9 БОЕ/мышь, после чего через 88 дней их заразили культурой *B. anthracis* штамм *Sterne* ($4 LD_{50}$). Из табл. 2 видно, что после введения *B. anthracis* штамм *Sterne* выжили 90–100% мышей, привитых рекомбинантными аденовирусами. Группа мышей,

которым вводили рекомбинантный аденовирус Ad-PA-Fc, характеризовалась более высокой степенью защиты, чем группы мышей, иммунизированных рекомбинантными аденовирусами Ad-sPA и Ad-cPA. Более того, мыши, иммунизированные Ad-sPA и Ad-

Таблица 2. Протективные свойства генетических вакцин на основе рекомбинантных аденовирусов на модели инбредных белых мышей линии Balb/c

Группа животных	Иммунизирующий препарат	Мыши, количество	Выжило	Пало	Защита, %
1	Ad-PA-Fc	9	9	0	100
2	PA + IFA	9	9	0	100
3	Ad-sPA	9	8	1	89
4	Ad-cPA	9	8	1	89
5	Ad-null	9	1	8	11.1
6	PBS	9	1	8	11.1



Рис. 5. Схема постановки эксперимента по защите иммунизированных животных от *B. anthracis*. Иммунизацию рекомбинантными аденовирусами проводили интраназально в дозе 4.6×10^9 БОЕ/мышь, в объеме 100 мкл. В качестве положительного контроля был использован полноценный белок PA с неполным адьювантом Фрейнда

cPA, теряли в весе и имели признаки болезненного состояния, в отличие от мышей, иммунизированных Ad-PA-Fc.

ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые Y. Tan в 2003 году сконструировал рекомбинантный аденовирус серотипа 5, кодирующий адаптированный для экспрессии в клетках человека протективный антиген [14]. Было показано, что внутримышечное введение 10^9 вирусных частиц индуцирует выработку анти-РА-антител, количество которых в 2.7 раза больше, чем при иммунизации субъединичной вакциной, применяемой для вакцинации людей в США. Примечательно, что рекомбинантный аденовирус индуцировал более быстрое формирование гуморального иммунного ответа, чем субъединичная вакцина. При иммунизации мышей с последующим введением сибиреязвенного токсина наблюдали защиту 75% экспериментальных животных, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом, тогда как субъединичная вакцина обеспечила только 25% защиты.

В 2005 году группой тех же авторов подобная работа была проделана на рекомбинантном аденовирусе серотипа 7 [15]. Они показали, что предсуществующий иммунный ответ к аденовирусу серотипа 5 у мышей преодолевается использованием аденовируса другого серотипа, и это позволяет защитить животных от летальной дозы сибиреязвенного токсина.

В качестве антигена использовали также не полную аминокислотную последовательность протективного антигена, а только его четвертый домен. Это было сделано с учетом того, что этот домен необходим для связывания с клеточным рецептором и, следовательно, блокируя антителами этот домен, можно добиться защитного иммунного ответа. Например, Y.Z. Yu и соавт. сконструировали две плазмиды, несущие секретлируемую и несекретлируемую формы четвертого домена протективного антигена [16]. После вакцинации животных этими плазмидами, значительно увеличился уровень интерферона γ (IFN- γ) и индуцировалась секреция анти-РА-антител. В другом исследовании M.J. McConnell и соавт. [13] экспрессировали четвертый домен протективного антигена, кодируемого аденовирусным вектором. При однократной иммунизации экспериментальных животных с последующим введением летальной дозы сибиреязвенного токсина удалось добиться 67% защиты. В следующей работе эти авторы изучали протективное действие рекомбинантного аденовируса при заражении мышей летальной дозой вакцинного штамма 34F2 [17]. Они применили стратегию иммунизации типа прайм-буста. Праймирование иммунитета плазмидной ДНК с последующим бустированием рекомбинантным аденовирусом, так же как праймирование макроорганизма рекомбинантным аденовирусом с последующим бустированием рекомбинантным аденовирусом, полностью защищало мышей от *B. anthracis*. Эти результаты показывают, что вак-

цинация рекомбинантным аденовирусом защищает от заражения сибирской язвой, и этот подход может быть эффективным в случае иммунизации против бактериальных и вирусных патогенов.

Отличительной чертой нашей работы было увеличение иммуногенности протективного антигена за счет его димеризации Fc-фрагментом антитела, а также способность этого фрагмента специфически связываться с макрофагами за счет Fc-рецепторов и активировать систему комплемента по классическому пути.

Способность к формированию димеров позволяет двум антигенным детерминантам располагаться на одной частице, что повышает степень иммуногенности димеризованного белка [18, 19]. Вероятным механизмом увеличения иммуногенности может быть активация многоцепочечных рецепторов иммунного распознавания (MIRR-receptors). MIRR-рецепторы при связывании лигандов сигнализируют при помощи ITAM-мотивов, активация которых приводит к поглощению иммунных комплексов и слиянию эндосом с МНСII-содержащими везикулами, содержащими молекулы главного комплекса тканевой совместимости [20, 21].

С другой стороны, если олигомеризующая основа химерного белка или сам антиген способны взаимодействовать с паттернраспознающим рецептором, то это позволяет максимально увеличить иммуногенность и уйти от применения дополнительного введения адъювантов [18]. В конечном итоге получается, что олигомеризующий белок выступает в роли «молекулярного адъюванта». В нашей работе к протективному антигену в слитый белок был добавлен Fc-фрагмент IgG2a *M. musculus*. Fc-фрагмент антитела способен приводить к активации классического пути системы комплемента, рецепторы которого являются паттернраспознающими и доставляют необходимый костимуляторный сигнал [22]. Результатом совместного действия на одной клетке MIRR- и паттернраспознающих рецепторов является презентация антигенных пептидов хелперным Т-лимфоцитам, способным оказывать помощь как Т-, так и В-клеткам. Возможно, благодаря этому рекомбинантный аденовирус, несущий PA-Fc, защищает сильнее, чем Ad-sPA и Ad-cPA (табл. 1).

Еще один важный момент – использование аденовирусного вектора в качестве носителя синтетического гена. Вследствие того, что синтез антигена происходит внутри трансдуцированных рекомбинантным аденовирусом клеток, часть молекул антигена подвергается процессингу и презентации пептидов в комплексе с молекулами МНС I-класса. Получившиеся на активированных клетках комплексы приводят к индукции цитотоксических Т-лимфоцитов,

которые принимают участие в защите от внутриклеточных патогенов, в том числе и *B. anthracis* [14, 15, 23]. В нашей работе с целью оценки действия цитотоксических Т-лимфоцитов был сконструирован рекомбинантный аденовирус Ad-cPA, несущий не-секретируемый вариант протективного антигена, и показана его способность защищать 89% экспериментальных животных (табл. 2). С другой стороны, секретлируемый вариант протективного антигена (Ad-sPA) без добавления «молекулярных адъювантов» обеспечивал аналогичную степень защиты. Таким образом, полученные нами результаты полностью согласуются с результатами другой группы исследователей [16]. Мы полагаем, что использование рекомбинантных аденовирусных векторов Ad-sPA и Ad-cPA позволяет добиться индукции антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов.

В представленной работе мы использовали интраназальное введение аденовирусных векторов, поскольку именно такой способ доставки рекомбинантных аденовирусов помогает преодолевать предсуществующий иммунный ответ к вектору [24]. Интраназальное введение имеет некоторые преимущества перед другими путями введения: это безыгольный, неинвазивный, безболезненный метод, он не требует медицинского персонала и может использоваться самим вакцинируемым. Кроме того, данные, полученные J. Zhang и соавт. [24], показали, что единичная интраназальная иммунизация рекомбинантным аденовирусным вектором, несущим ген протективного антигена, защищает мышей от *B. anthracis* на фоне предсуществующего иммунного ответа к аденовирусному вектору.

Примечательна подклассовая принадлежность антител IgG к протективному антигену, индуцируемая при иммунизации рекомбинантными аденовирусами. В наших экспериментах были выявлены подклассы антител, вырабатываемые при развитии иммунного ответа по типу Th1 (максимум антител подкласса IgG2a), в то время как при использовании неполного адъюванта Фрейнда иммунный ответ проходит по типу Th2 (максимум антител подкласса IgG2b). Возможно, благодаря этому мыши, иммунизированные рекомбинантными аденовирусами в первом эксперименте, обладали большей степенью защиты по сравнению с положительным контролем (рис. 4; табл. 1). Наши результаты согласуются с данными группы Y. Tan [14], который показал аналогичный профиль подклассов антител при аденовирусной иммунизации. Отличительной особенностью нашей работы было лишь полное отсутствие IgG3, в то время как у Y. Tan данный подкласс антител присутствовал, но в значительно меньших количествах, чем других IgG.

Интересно, что к протективному антигену *B. anthracis* могут вырабатываться два типа антител. Первые способны связывать единичные молекулы РА и нейтрализовать их, т.е. стерически блокировать белок-белковые взаимодействия между молекулами РА. Антитела второго типа взаимодействуют только с олигомерными комплексами протективного антигена и изменяют их структуру так, что они не могут взаимодействовать с рецепторами на клетках [25], т.е. антитела второго типа вырабатываются только в присутствии олигомеризованных молекул антигена, комплекс которых пронизывает мембраны эукариотических клеток. Так как четвертый домен РА располагается на С-конце белка, а в нашей конструкции (РА-Fc) находится на N-конце (для функциональной активности Fc-фрагмента антитела), мы сконструировали рекомбинантный аденовирус, несущий Fc-фрагмент на N-конце белка, а четвертый домен РА на С-конце белка. Полученный рекомби-

нантный аденовирус (Ad-Fc-РА) исследовали в описанных экспериментах. Оказалось, что он обладал такими же иммуногенными и протективными свойствами, как и рекомбинантный аденовирус Ad-РА-Fc (данные не показаны).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали, что иммунизация рекомбинантным аденовирусом может обеспечивать защиту против заражения бескапсульным штаммом *B. anthracis*. Ad-РА-Fc, несущий Fc-фрагмент антитела, соединенный с протективным антигеном, обеспечивает более высокую степень защиты по сравнению с Ad-sРА и Ad-cРА. Кроме того, иммунизация Ad-РА-Fc способна полностью защищать мышей в течение 3 месяцев после иммунизации. В дальнейшем мы планируем перейти к опытам на морских свинках с использованием спор капсулообразующих штаммов *B. anthracis*. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Guichard A., Nizet V., Bier E. // *Microbes Infect.* 2012. V. 14. № 2. P. 97–118.
- Brachman P.S. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1980. № 353. P. 83–93.
- Davies J.C.A. // *Central African J. Med.* 1982. № 28. P. 291–298.
- Davies J.C.A. // *Central African J. Med.* 1983. № 29. P. 8–12.
- Davies J.C.A. // *Central African J. Med.* 1985. № 31. P. 176–180.
- Metcalfe N. // *Occup. Med.* 2004. V. 54. № 7. P. 489–493.
- Meaney-Delman D., Zotti M.E., Rasmussen S.A., Strasser S., Shadomy S., Turcios-Ruiz R.M., Wendel G.D., Treadwell T.A., Jamieson D.J., Gladus M.A., et al. // *Obstet. Gynecol.* Dec. 2012. V. 120. № 6. P. 1439–1449.
- Ипатенко Н.Г., Гаврилов В.А., Маничев А.А., Бастаров С.И., Саленко Л.С., Яковлева Т.Н., Степанова В.В., Шморгун Б.И., Киселев Ю.Т., Сайиткулов Б.С. // *Ветеринария.* 1995. № 5. С. 27–30.
- Auerbach S., Wright G.G. // *J. Immunol.* 1955. V. 75. № 2. P. 129–133.
- Broster M.G., Hibbs S.E. // *Salisbury Med. Bull. Sp. Suppl.* 1990. № 68. P. 91–92.
- Little S.F., Knudson G.B., Neidhardt F.C. // *Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol.* 1984. P. 46.
- Ward M.K., McGann V.G., Hogge A.L., Huff M.L., Kanode R.G., Roberts E.O. // *J. Infect. Dis.* 1965. № 115. P. 59–67.
- McConnell M.J., Hanna P.C., Imperiale M.J. // *Infect. Immun.* 2006. V. 74. № 2. P. 1009–1015.
- Tan Y., Hackett N.R., Boyer J.L., Crystal R.G. // *Hum. Gene. Ther.* 2003. V. 14. № 17. P. 1673–1682.
- Hashimoto M., Boyer J.L., Hackett N.R., Wilson J.M., Crystal R.G. // *Infect. Immun.* 2005. V. 73. № 10. P. 6885–6891.
- Yu Y.Z., Li N., Wang W.B., Wang S., Ma Y., Yu W.Y., Sun Z.W. // *Vaccine.* 2010. V. 28. № 47. P. 7529–7535.
- McConnell M.J., Hanna P.C., Imperiale M.J. // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. № 1. P. 203–210.
- Щербинин Д.Н., Шмаров М.М., Народицкий Б.С., Рубакова Э.И., Кондратьева Т.К. // *Туберкулез и болезни легких.* 2010. Т. 87. № 10. С. 50–53.
- Щербинин Д.Н., Турыхина И.Л., Логунов Д.Ю., Шмаров М.М., Апт А.С., Кондратьева Т.К., Народицкий Б.С. // *Мед. иммунол.* 2011. Т. 13. № 4–5. P. 347.
- Sigalov A.B. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008. № 640. P. 121–163.
- Graham D.B., Akilesh H.M., Gmyrek G.B., Piccio L., Gilfillan S., Sim J., Belizaire R., Carrero J.A., Wang Y., Blaufuss G.S., et al. // *Blood.* 2010. V. 116. № 17. P. 3208–3218.
- Walport M.J. // *N. Engl. J. Med.* 2001. V. 344. № 14. P. 1058–1066.
- Tutykhina I.L., Logunov D.Y., Shcherbinin D.N., Shmarov M.M., Tukhvatulin A.I., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // *J. Mol. Med.* 2011. V. 89. № 4. P. 331–341.
- Zhang J., Jex E., Feng T., Sivko G.S., Baillie L.W., Goldman S., van Kampen K.R., Tang D.C. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2013. V. 20. № 1. P. 1–8.
- Radjainia M., Hyun J.K., Leysath C.E., Leppla S.H., Mitra A.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 32. P. 14070–14074.