

УДК 571.27:578.224

Индукция протективного гетеросубтипического иммунного ответа против вируса гриппа при иммунизации рекомбинантными аденовирусными векторами, экспрессирующими гемагглютинин вируса гриппа H5

М.М. Шмаров^{1*}, Е.С. Седова¹, Л.В. Верховская¹, И.А. Руднева², Е.А. Богачева¹, Ю.А. Барыкова¹, Д.Н. Щербинин¹, А.А. Лысенко¹, И.Л. Тутьихина¹, Д.Ю. Логунов¹, Ю.А. Смирнов², Б.С. Народицкий¹, А.Л. Гинцбург¹

¹ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи РАМН, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

² Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

*E-mail: mmshmarov@gmail.com

РЕФЕРАТ Вирусы гриппа характеризуются большой антигенной вариабельностью, что приводит к ежегодному возникновению эпидемий, а через нерегулярные интервалы времени – пандемий, вызываемых вирусами гриппа с новыми антигенными и биологическими свойствами. Решить проблему защиты населения от эпидемий вируса гриппа могут помочь новые подходы к вакцинации, одним из которых является применение генетических вакцин, созданных на основе аденовирусных векторов. Рекомбинантные аденовирусные векторы, несущие гены гемагглютинина вирусов гриппа птиц H5N1 и H5N2 (Ad-NA5-1 и Ad-NA5-2), были получены с использованием системы AdEasy Adenoviral Vector System (Stratagene). Лабораторные мыши были двукратно интраназально иммунизированы Ad-NA5-1 и Ad-NA5-2. Показано, что иммунизация рекомбинантными аденовирусами, несущими ген гемагглютинина вируса гриппа H5, обеспечивает индукцию протективного иммунного ответа, защищающего иммунизированных мышей не только от летальной дозы вируса гриппа H5 другого субтипа, но и от летальной дозы вируса гриппа подтипа H1, относящегося к тому же клайду, что и H5, но не обеспечивает защиту мышей против вируса гриппа подтипа H3, относящегося к другому клайду.

Полученные нами данные позволяют сделать вывод, что аденовирусные векторы могут служить универсальной платформой для получения вакцин как от сезонных, так и от пандемических штаммов вируса гриппа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аденовирусный вектор, вирус гриппа, гемагглютинин, иммунизация, гетеросубтипическая защита.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы гриппа А способны вызывать чрезвычайные эпидемические ситуации. Эти вирусы широко распространены в природе и могут поражать людей, многие виды млекопитающих (лошадей, свиней, тюленей и т.д.), а также все виды птиц [6, 17]. Традиционно для обозначения различных штаммов вируса гриппа используются цифровые индикаторы подтипов их поверхностных антигенов – гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA). Всего идентифицировано 15 подтипов гемагглютинина и 9 подтипов нейраминидазы,

с минимальной перекрестной активностью между подтипами в серологических реакциях [18]. В настоящее время среди людей циркулируют вирусы двух подтипов гемагглютинина (H1, H3) и двух нейраминидазы (N1—N2) [18, 20]. Кроме того, потенциальную угрозу для человека представляют вирусы гриппа птиц, содержащие гемагглютинин H5, т.к. начиная с 1997 г. неоднократно регистрировались случаи заболевания людей вирусами субтипа H5N1. Этот вирус был впервые детектирован у человека в Китае более 10 лет назад [7], и, по данным ВОЗ, общее количество случаев заболеваний

человека вирусом H5N1 составляет 478, из которых 286 – с летальным исходом (данные ВОЗ от 17.02.10).

Вирусы гриппа А характеризуются большой антигенной вариабельностью. Наиболее подвержены изменениям поверхностные гликопротеины вириона – гемагглютинин и нейраминидаза. Известны два пути изменения. Первый – антигенный дрейф. Под давлением популяционного иммунитета мутации, позволяющие уйти из-под контроля иммунной системы, дают вирусу серьезное преимущество и закрепляются. В итоге новые антигенные варианты гемагглютинина и нейраминидазы постоянно сменяют друг друга. В результате возникают эпидемии, т.к. защита от предыдущих штаммов вирусов, в т.ч. того же самого субтипа, недостаточна для нейтрализации нового штамма.

К сожалению, применение современных субъединичных и инактивированных вакцин не решает эту проблему, т.к. обеспечивает хорошую защиту только от штамма, из которого они были получены. Поэтому в настоящее время для защиты населения от новых эпидемических штаммов требуется постоянно создавать новые вакцины.

Второй путь изменения вирусов гриппа – антигенный шифт, т.е. изменение антигенной формулы вируса в результате замены гена (генов) и соответствующего белка (белков). В основе механизма антигенного шифта лежит реассортация или рекомбинация генов, которая может происходить при совместной инфекции двумя и более вирусами [19]. Шифтовые изменения, как правило, затрагивают антигенную структуру гемагглютинина, реже – нейраминидазы. Таким образом, через нерегулярные интервалы времени появляются пандемические варианты вирусов гриппа с новыми антигенными и биологическими свойствами, которые вызывают тяжелые заболевания и гибель людей [6, 17]. Например, пандемия «испанки» – вируса гриппа H1N1, в 1918–1920 гг. привела к смерти около 50 млн человек по всему миру. В июне 2009 г. Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) присвоила новому вирусу H1N1, случаи заболевания которым начали детектировать в начале апреля 2009 г., шестую степень угрозы пандемии. Этот вирус представляет собой реассортант, содержащий гены птичьего, человеческого и свиного вирусов [8].

При возникновении нового пандемического штамма создание вакцины занимает слишком много времени, что не позволяет быстро остановить распространение опасного вируса. Для решения этой проблемы необходимы новые подходы к вакцинации против вируса гриппа. Одним из таких подходов являются генетические вакцины, базирующиеся на вирусных векторах [5, 11]. Наиболее перспективными представляются генетические вакцины, созданные с использованием аденовирусных векторов [1, 2].

Долгое время считалось, что гриппозные вакцины, в т.ч. и генно-инженерные, действующим началом которых являются вариабельные поверхностные белки вируса гриппа (гемагглютинин и/или нейраминидаза), строго специфичны и защищают только от того штамма, антиген которого присутствует в вакцинном препарате. Однако в последние годы (2008–2009) появились работы, согласно которым генетические вакцины на основе аденовирусов, несущих ген гемагглютинина вируса гриппа А, способны индуцировать перекрестный иммунитет как в пределах одного субтипа вируса гриппа [3], так и между разными

субтипами вируса, включающими один и тот же подтип гемагглютинина [15].

Такой эффект объясняется тем, что при вакцинации аденовирусными векторами в организм вводится ген гемагглютинина вируса гриппа, который эффективно экспрессируется в клетке и экспонируется на плазматической мембране, что позволяет сохранить его нативную третичную структуру. При этом индуцируется как клеточный, так и гуморальный ответ на консервативные эпитопы гемагглютинина вируса гриппа. Так, показано, что антитела, полученные из плазматических клеток людей, инфицированных вирусом гриппа H5N1, могут обеспечивать перекрестную нейтрализацию вирусов подтипа H1 [4]. В 2008 г. были опубликованы данные, согласно которым вирусы гриппа (по наличию высококонсервативных конформационных эпитопов в составе гемагглютинина для антител широкого спектра действия) можно разделить на две группы. Первая группа содержит подтипы H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 и H16, а вторая – подтипы H3, H4, H7, H10, H14 и H15. Антитела против антигенных детерминант вирусов первой группы в разной степени обеспечивают нейтрализацию этих подтипов, но не обеспечивают нейтрализацию подтипов из второй группы [14]. Эти группы, в соответствии с наличием консервативных эпитопов, были разделены на четыре подгруппы, или клайда: H1 (H1, H2, H5, H6, H11, H13 и H16 гемагглютинины), H9 (H9, H8 и H12), H7 (H15, H7 и H10) и H3 клайд (H3, H14 и H4).

Таким образом, нами было высказано предположение о том, что вакцинация аденовирусным вектором, несущим ген гемагглютинина вируса гриппа А, может приводить к образованию антител к консервативным, в т.ч. конформационным, эпитопам основного поверхностного антигена вируса гриппа А, что обеспечит перекрестный иммунный ответ не только против вирусов гриппа А внутри одного подтипа, но и против вирусов гриппа А разных подтипов, относящихся к одному клайду.

В настоящей работе использовались рекомбинантные аденовирусы человека пятого серотипа, несущие гены гемагглютининов вируса гриппа птиц H5N2 и H5N1, т.к. вирусы гриппа птиц подтипа H5 являются вероятными кандидатами на роль следующего пандемического штамма. Было показано, что иммунизация рекомбинантными аденовирусами обеспечивает индукцию протективного иммунного ответа, защищающего иммунизированных мышей не только от летальной дозы вируса гриппа «своего» штамма H5, но и от летальной дозы вируса гриппа H5 другого субтипа, а также летальной дозы вируса гриппа подтипа H1, относящегося к тому же клайду, что и H5, но не обеспечивает протекцию мышей против вируса гриппа подтипа H3, относящегося к другому клайду.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вирусы. В работе использовали вирус гриппа птиц A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), вирусы гриппа человека A/USSR/90/77 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2), адаптированные для мышей [9]. Вирусы были накоплены в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов при 37 °С в течение 48 ч. Вирусодержащая аллантоисная жидкость хранилась при -70 °С. Титр вируса был определен титрованием в куриных эмбрионах. 50 %-ная летальная доза (LD₅₀) была определена путем титрования на мышах.

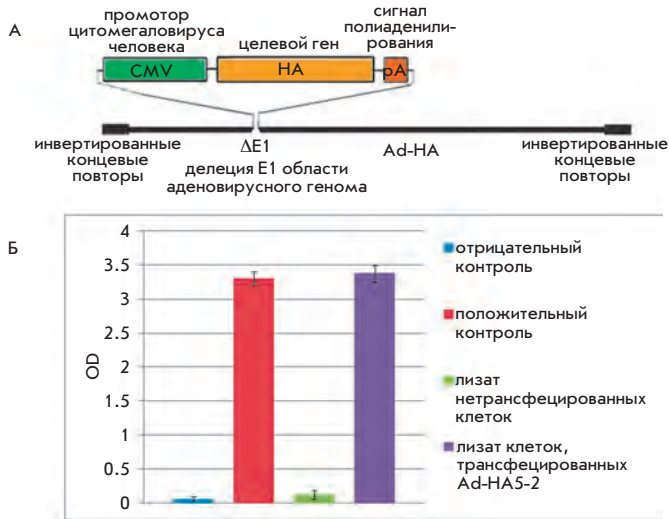


Рис. 1. Рекombинантный аденовирус человека пятого серотипа экспрессирует гемагглютинин вируса гриппа птиц H5N2 (A/Mallard/Pennsylvania/10218/84) в инфицированных клетках. А. Схема генома рекombинантного аденовируса, несущего гемагглютинин вируса гриппа. В. Экспрессия гемагглютинина вируса гриппа H5N2 клеточной линией 293 эмбриональной почки человека, инфицированной Ad-HA5-2 (ИФА): ■ – отрицательный контроль, ■ – положительный контроль, ■ – лизат клеток, нетрансфицированных Ad-HA5-2, ■ – лизат клеток, трансфицированных Ad-HA5-2

Получение рекombинантного аденовируса. Для получения плазмид и рекombинантных аденовирусных векторов использовали гены гемагглютинина вируса гриппа птиц штамма A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) и A/Duck/Novosibirsk/56/2005 (H5N1) (H5-2 и H5-1, соответственно). кДНК генома вируса A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) была получена методом обратной транскрипции с использованием Reverse Transcription System (Invitrogene, USA). Ген гемагглютинина HA5-2 был получен путем амплификации кДНК с праймерами, фланкирующими последовательность гена гемагглютинина.

Ген гемагглютинина H5-1 был предоставлен лабораторией диагностики вирусных болезней птиц Федерального государственного учреждения «Федеральный центр охраны здоровья животных города Владимир» (ФГУФЦО ЗЖ).

Для получения рекombинантных аденовирусов Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2 методом гомологичной рекombинации в клетках E.coli была использована система AdEasy Adenoviral Vector System (Stratagene). Полученные препараты рекombинантных аденовирусов были очищены и сконцентрированы двукратным ультрацентрифугированием в градиенте хлористого цезия.

В качестве контроля использовался рекombинантный аденовирус человека пятого серотипа без экспрессирующей кассеты в участке делеции E1 области генома (Ad-null).

Титры препаратов Ad-HA5-1, Ad-HA5-2 и Ad-null определяли методом бляшкообразования на культуре клеток HEK-293.

Детекция экспрессии гена гемагглютинина вируса гриппа птиц методом ИФА. Детекцию экспрессии генов гемагглютинина в составе рекombинантных аденовирусов проводили на клетках линии HEK-293, к которым добавляли аденовирусные векторы Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2 в дозе 100 частиц на клетку. После 24 ч инкубации клетки лизировали. Для постановки ИФА использовали набор для детекции гемагглютинина вируса гриппа птиц A штамма H5 (BioAssay).

Определение уровня гемагглютинин-связывающих антител в сыворотках крови мышей. Определения уровня антител в сыворотках крови мышей проводили через 21 день после второй иммунизации. Для определения уровня гемагглютинин-связывающих антител в сыворотке крови мышей использовали реакцию торможения гемагглютинина, в соответствии с протоколом WHO/CDS/CRS/NCS/2002.5 с использованием куриных эритроцитов.

Мыши. В работе были использованы мыши линии BALB/c, весом 7–9 г, самки.

Иммунизация животных. Мыши были разбиты на группы (по 10 особей в группе) и иммунизированы двукратно интраназально рекombинантными аденовирусами Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2 в количестве 10^8 БОЕ/мышь. Интервал между иммунизациями составил 21 день. Контрольным группам были введены аденовирусный вектор Ad-null или фосфатный буфер PBS.

Заражение животных. Через 21 день после второй иммунизации мышам под легким эфирным наркозом интраназально вводили высокую летальную дозу ($50 LD_{50}$) вируса гриппа штаммов A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) или летальные дозы ($10 LD_{50}$) вирусов гриппа A/USSR/90/77 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2). Выживаемость и изменение веса мышей оценивали в течение 16 дней после заражения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Детекция экспрессии генов гемагглютинина в составе рекombинантных аденовирусов Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2. Схема генома рекombинантных аденовирусов Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2, которые были получены методом гомологичной рекombинации в клетках E.coli, представлены на рис. 1А. В полученных препаратах аденовирусных векторов методом ПЦР было показано наличие в составе геномной ДНК вставок генов гемагглютинина вируса гриппа птиц штаммов H5N1 и H5N2 (данные не представлены).

В результате анализа лизата клеток линии HEK-293, инфицированных рекombинантным аденовирусом Ad-HA5-2, ELISA набором для детекции гемагглютинина вируса гриппа птиц H5 был определен уровень экспрессии рекombинантного гемагглютинина H5 (рис. 1Б).

Таким же образом была подтверждена экспрессия аденовирусным вектором Ad-HA5-1 гена гемагглютинина вируса гриппа птиц штамма H5N1 (данные не представлены).

Определение иммуногенности гемагглютинина, экспрессируемого аденовирусом Ad-HA5-2 и перекрестной иммуногенности гемагглютинина, экспрессируемого аденовирусом Ad-HA5-1.

Уровень антител к гемагглютину, экспрессируемому рекombинантным аденовирусом Ad-HA5-2, определяли

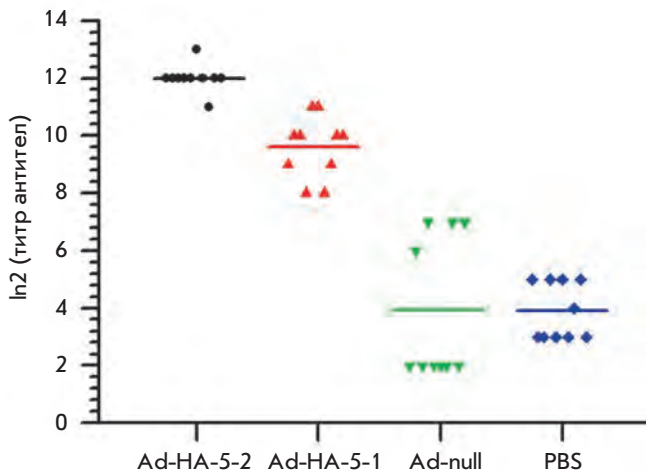


Рис. 2. Уровень специфических гемагглютинирующих антител к вирусу гриппа птиц H5N2 в сыворотках крови мышей, иммунизированных рекомбинантными аденовирусами Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2. Мыши были двукратно иммунизированы аденовирусами Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2. В качестве контроля использовали мышей, которым двукратно вводился Ad-null и фосфатный буфер PBS. Титр антител в сыворотках крови мышей определялся в РТГА против вируса гриппа А/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2). Между вакцинированными Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2 группами и контрольными Ad-null и PBS группами было зафиксировано достоверное различие ($p < 0.05$)

в РТГА. Для этого мышей линии BALB/c иммунизировали аденовирусом Ad-HA5-2. В качестве контрольных использовались группы мышей, которым вводили фосфатный буфер PBS. Полученные через 21 день после повторной иммунизации сыворотки анализировали на наличие специфических антител к гемагглютинуину вируса гриппа птиц штамма A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2). Результаты РТГА представлены на рис. 2. В сыворотке мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом Ad-HA5-2, был определен высокий уровень антител, препятствующих агглютинации эритроцитов вирусом гриппа птиц H5N2.

Полученные данные свидетельствуют об индукции гуморального иммунного ответа, специфического к вирусу гриппа птиц H5N2, в ответ на интраназальное введение рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего ген гемагглютинаина H5.

Аналогичным образом проводили оценку перекрестной иммуногенности белка гемагглютинаина, экспрессируемого аденовирусным вектором Ad-HA5-1. Полученные после иммунизации образцы сывороток были проанализированы на наличие специфических антител к гемагглютинуину вируса гриппа птиц штамма A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) методом РТГА (рис. 2). В сыворотках крови мышей был определен высокий уровень антител, препятствующих агглютинации эритроцитов вирусом гриппа птиц H5N2.

Полученные результаты свидетельствуют об индукции гетеросубтипического перекрестного гуморального иммунного ответа, специфического к вирусу гриппа птиц

H5N2, индуцируемого в ответ на иммунизацию мышей рекомбинантным аденовирусом, несущим ген гемагглютинаина вируса гриппа птиц H5N1. Количество антител к гемагглютинуину вируса гриппа H5N1 хоть и ниже, чем при иммунизации мышей аденовирусным вектором с гемагглютинином вируса гриппа H5N2, но достаточно высок по сравнению с контрольной группой.

В контрольных (PBS) сыворотках наблюдалось неспецифическое торможение гемагглютинации за счет компонентов сыворотки крови мышей.

Защита мышей, иммунизированных Ad-HA5-2, и перекрестная защита мышей, иммунизированных Ad-HA5-1, против заражения вирусом гриппа птиц H5N2. Для изучения протективного действия двукратной иммунизации аденовирусом Ad-HA5-2 иммунизированных животных заражали летальной дозой (50 LD₅₀) вируса гриппа A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2). Мышам контрольных групп вводили рекомбинантный аденовирус Ad-null и фосфатный буфер PBS. Мыши, иммунизированные рекомбинантным аденовирусом Ad-HA5-2, после заражения вирусом гриппа не теряли в весе и показали 100 %-ную выживаемость. При этом в контрольной группе PBS наблюдалась гибель 100 % мышей в течение 10 дней и падение веса на 20 %, а в контрольной группе, иммунизированной Ad-null, выжило 20 % мышей, и падение веса составило около 30 % (рис. 3).

Таким образом, иммунизация рекомбинантным аденовирусом Ad-HA5-2 обеспечивает защиту мышей против заражения летальной дозой вируса гриппа H5N2.

Для изучения возможности формирования перекрестного протективного иммунного ответа мышей иммунизировали, как описано ранее, рекомбинантным аденовирусом Ad-HA5-1 и так же заражали летальной дозой (50 LD₅₀) вируса A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2). Показано, что иммунизация мышей аденовирусом Ad-HA5-1 приводит к формированию гетеросубтипического перекрестного иммунного ответа против вируса гриппа H5N2. Иммунизированные аденовирусом мыши не теряли в весе и продемонстрировали 100 %-ную выживаемость (рис. 3).

Определение перекрестной иммуногенности гемагглютинаина, экспрессируемого аденовирусом Ad-HA5-2, против вирусов гриппа H1N1 и H3N2.

Оценку перекрестной иммуногенности рекомбинантного гемагглютинаина, экспрессируемого аденовирусом Ad-HA5-2, проводили в РТГА. Для этого мышей линии BALB/c иммунизировали аденовирусом Ad-HA5-2, как описано ранее. Мышам контрольной группы вводили интраназально фосфатный буфер. Образцы сывороток у мышей отбирали через 21 день после повторной иммунизации. Полученные образцы сывороток анализировали на наличие антител к гемагглютинуину вирусов гриппа штаммов A/USSR/90/77 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2) (результат представлен на рис. 4). В сыворотках крови мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом Ad-HA5-2, был детектирован достоверный прирост титра антител в РТГА к вирусу H1N1 в сравнении с контрольной группой. Разница между уровнем антител в РТГА против вируса H3N2, в иммунизированной Ad-HA5-2 группе, и уровнем неспецифического торможения гемагглютинации за счет компонентов сыворотки крови мышей была статистически не достоверна.

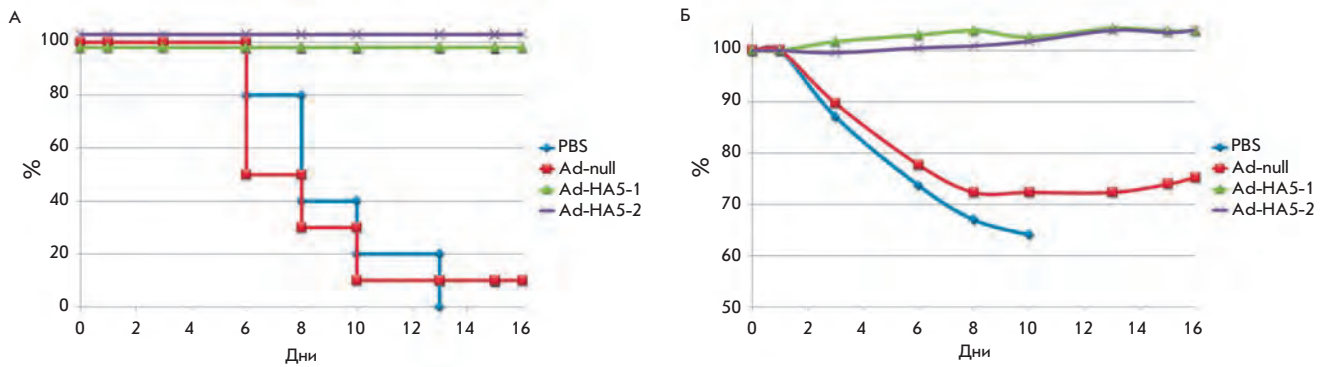


Рис. 3. Анализ протективности гемагглютинин-специфического иммунного ответа мышей, иммунизированных рекомбинантными аденовирусами Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2, с последующим заражением летальной дозой вируса гриппа птиц H5N2. А. Выживаемость мышей, зараженных летальной дозой (50LD₅₀) вируса гриппа штамма A/Mallard/Pennsylvania/10218/84H5N2 (H5N2). Мыши были двукратно иммунизированы аденовирусами Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2. В качестве контроля использовали мышей, двукратно иммунизированных Ad-null и фосфатным буфером PBS. Различия между выживаемостью в группах Ad-HA5-2 (Ad-HA5-1) и контрольной группой PBS ($p < 0.00001$), а также контрольной группой Ad-null ($p < 0.0001$) являются статистически достоверными. Б. Изменение веса мышей, зараженных летальной дозой (50LD₅₀) вируса гриппа штамма A/Mallard/Pennsylvania/10218/84H5N2 (H5N2).

Полученный результат свидетельствует об индукции гуморального иммунного ответа, специфичного к вирусу гриппа H1N1, в ответ на введение рекомбинантного аденовируса Ad-HA5-2. При этом уровень гуморального иммунного ответа, специфического к вирусу гриппа H3N2, можно считать незначительным.

Изучение перекрестной защиты мышей, иммунизированных Ad-HA5-2, против вирусов гриппа А H1N1 и H3N2. После двукратной иммунизации Ad-HA5-2 мыши были заражены летальными дозами (10 LD₅₀) вирусов A/USSR/90/77 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2). Мышам контрольной группы вводили интраназально фосфатный буфер. Эксперимент показал, что иммунизация животных рекомбинантным аденовирусом Ad-HA5-2 обеспечивает протекцию мышей против заражения летальной дозой вируса гриппа А H1N1. В течение всего срока наблюдения животные не гибли, и падение их веса составило 5%. В контрольной группе PBS наблюдалась гибель 100% мышей в течение 9 дней и падение веса животных на 30%. При этом иммунизация мышей аденовирусом Ad-HA5-2 не обеспечивала защиту мышей против заражения летальной дозой вируса гриппа А H3N2: иммунизированные мыши показали только 20%-ную выживаемость и почти 40%-ную потерю веса (рис. 5).

Обсуждение. Защита человека от постоянных атак вирусов гриппа осложняется трудностью прогнозирования появления новых пандемических и эпидемических штаммов, а также низкой перекрестной реактивностью инактивированных и субъединичных вакцин, которые обеспечивают хорошую защиту только от того штамма вируса гриппа, против которого они были произведены. Вакцинация, обеспечивающая широкую перекрестную защиту против потенциально опасных штаммов вируса гриппа, является пока труднодостижимой целью.

Известно, что при заболевании вирусом гриппа возможно формирование гетеросубтипического иммунитета, основанного как на гуморальном, так и на клеточном иммунном ответе. Гетеросубтипический иммунитет может значительно сократить срок заболевания и ослабить симптомы при последующем заражении другим штаммом вируса гриппа [21]. Формирование гетеросубтипического иммунного ответа в том числе связано с наличием консервативных для различных штаммов конформационных эпитопов гемагглютининов вируса гриппа.

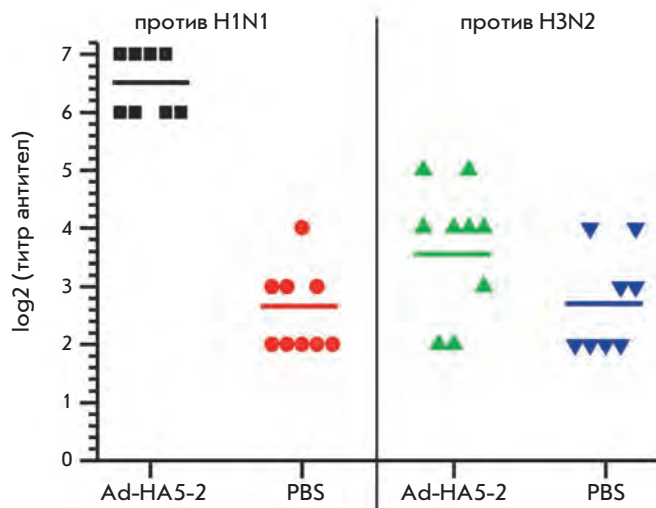


Рис. 4. Уровень специфических гемагглютинирующих антител к вирусам гриппа H1N1 и H3N2 в сыворотках крови мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом Ad-HA5-2. Мыши были двукратно иммунизированы аденовирусом Ad-HA5-2. В качестве контроля использовали мышей, двукратно иммунизированных фосфатным буфером PBS. Титр антител в сыворотках крови мышей определялся в РТГА против вирусов гриппа A/USSR/90/77 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2). Различия между вакцинированными и контрольными группами для РТГА против вируса гриппа H1N1 были статистически достоверны ($p = 0.05$), а для РТГА против вируса гриппа H3N2 статистически недостоверны ($p > 0.05$).

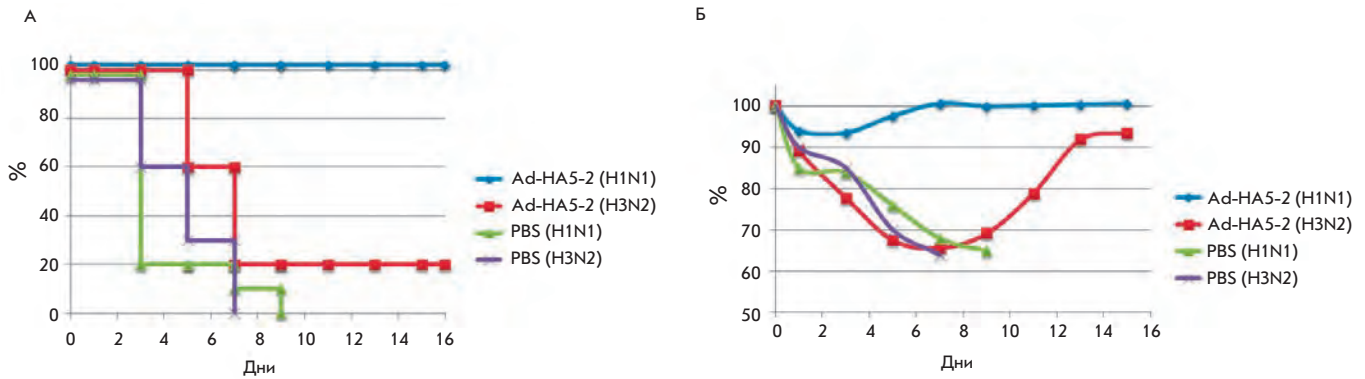


Рис. 5. Анализ протективности геммагглютинин-специфического иммунного ответа мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом Ad-HA5-2, против заражения летальной дозой вирусов гриппа H1N1 и H3N2. А. Выживаемость мышей, зараженных летальной дозой (10LD₅₀) вирусов гриппа штаммов A/USSR/90/77 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2). Мыши были двукратно иммунизированы аденовирусом Ad-HA5-2 в концентрации 10⁸ БОЕ/мышь. В качестве контроля использовали мышей, которым двукратно вводили фосфатный буфер PBS. Различия между выживаемостью в группе Ad-HA5-2 и контрольной группе PBS (заражение H1N1) являются статистически достоверными (p<0.0007), различия между выживаемостью в группе Ad-HA5-2 и контрольной группе PBS (заражение H3N2) являются статистически не достоверными (p=0.5). В. Изменение веса мышей, зараженных летальной дозой (10LD₅₀) вирусов гриппа штаммов A/USSR/90/77 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2)

Ранее было описано существование конформационного эпитопа у геммагглютинаина вируса гриппа А, общего для вирусов нескольких подтипов [10]. Согласно недавним исследованиям, различные подтипы вируса гриппа разделены на группы (клайды) по наличию консервативных эпитопов геммагглютинаина, антитела к которым способны нейтрализовать широкий спектр вирусных подтипов. Это объясняется генетическим родством между геммагглютинаинами различных подтипов вирусов гриппа. На рис. 6 показано филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей геммагглютининов вирусов гриппа А разных подтипов. Вирусы H1, H2 и H5 подтипов являются генетически родственными между собой и поэтому имеют общие конформационные эпитопы, в то время как вирусы H9, H7 и H3

подтипов имеют низкую степень гомологии, и, как следствие, перекрестного иммунитета между этими подтипами не образуется. Так как в первый клайд входят подтипы вирусов гриппа, имеющие пандемический потенциал, такие как H5, H1 и H2, это делает вакцины широкого спектра действия в пределах этой группы особенно ценными [12].

Таким образом, вакцины, сохраняющие стабильную третичную структуру поверхностных антигенов, должны обеспечивать хорошую защиту от разных штаммов вируса гриппа. При получении субъединичных и инактивированных вакцин структура поверхностных антигенов вируса гриппа может нарушаться, а применение живых гриппозных вакцин позволяет получить антитела широкого спектра действия, но связано с рядом существенных ограничений.

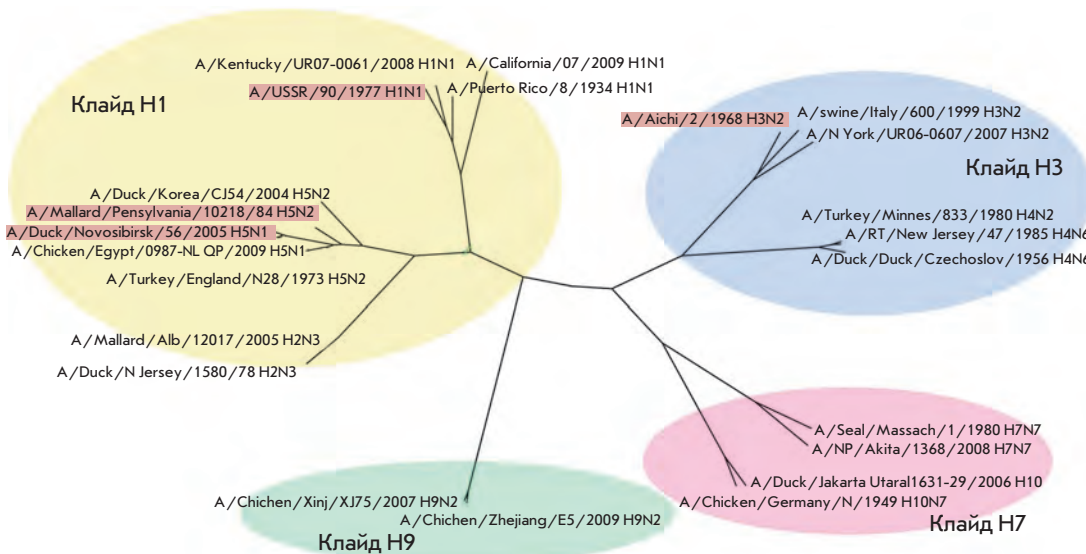


Рис. 6. Филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей геммагглютининов вирусов гриппа А разных субтипов. Вирусы гриппа различных субтипов объединены в четыре клайда на основании степени их филогенетического родства. Используемые в данной работе штаммы вирусов (выделенные цветом), относятся к клайдам H1 и H3

Иммунизация рекомбинантными аденовирусными векторами, несущими гены поверхностных белков вируса гриппа, приводит к экспрессии на клеточной поверхности антигенов вируса гриппа с сохраненной третичной структурой, что позволяет добиться формирования гетеросубтипического иммунитета, в т.ч. антител широкого спектра действия к консервативным эпитопам гемагглютиниона.

В данной работе использовались аденовирусные вектора с делетированными E1 и E3 областями генома аденовируса, что позволяет получать репликативно-дефектные аденовирусные частицы и делает возможным их потенциальное использование в качестве вакцинных препаратов. К преимуществам рекомбинантных аденовирусов относятся высокий уровень экспрессии трансгена в широком диапазоне эукариотических клеток, индукция как гуморального, так и клеточного иммунного ответа на трансгенный продукт, а также безопасность для человека, показанная на добровольцах [16]. В 2008 г. в США была успешно проведена первая фаза клинических испытаний назальной вакцины на основе рекомбинантного репликативно-дефектного аденовируса человека пятого серотипа, несущего ген гемагглютиниона, против вируса гриппа H5 [13].

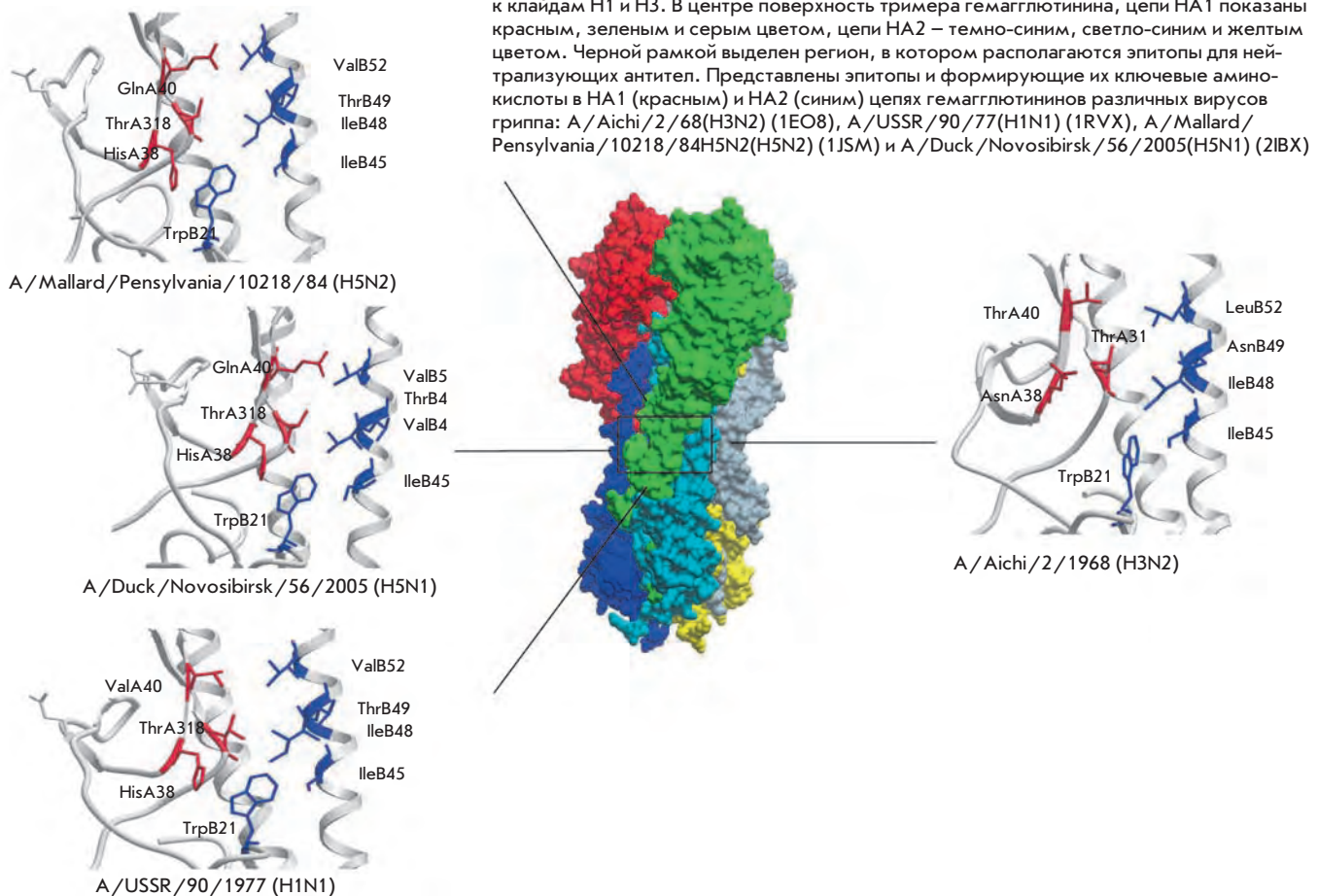
В нашей работе были использованы гены гемагглютининов аденовирусов гриппа А птиц H5N1 и H5N2, т.к. вирусы гриппа

птиц, и особенно штамм H5N1, вызывают сейчас наибольшие опасения. Этот вирус характеризуется более чем 50 %-ной летальностью среди людей, и в случае приобретения им способности передаваться от человека к человеку может привести к пандемии с огромными человеческими жертвами.

Нами были сконструированы аденовирусные вектора Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2 на основе аденовируса человека пятого серотипа, несущие гены гемагглютининов вирусов гриппа A/Duck/Novosibirsk/56/2005 (H5N1) и A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2). Анализ аминокислотной последовательности гемагглютининов этих вирусов показал гомологию между ними в 94.6 % (<http://align.genome.jp/>).

Проверка иммуногенности полученного нами аденовируса Ad-HA5-2 показала, что в ответ на двукратное интраназальное введение рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего ген гемагглютиниона вируса H5N2, у мышей происходит выработка высокого уровня антител, специфичных к вирусу гриппа птиц A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2).

Также показано, что двукратная иммунизация мышей аденовирусом Ad-HA5-1, несущим ген гемагглютиниона вируса гриппа H5N1, приводит к образованию высокого титра перекрестных антител к вирусу гриппа птиц A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2).



Иммунизация мышей аденовирусами Ad-NA5-2 и Ad-NA5-1 обеспечивает защиту от высокой летальной дозы (50 LD₅₀) вируса гриппа A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2). На примере иммунизации мышей аденовирусным вектором Ad-null, не несущим экспрессирующей кассеты с геном, был оценен вклад самого вектора в защиту против вируса гриппа А, и показано, что иммунизация Ad-null защищает 20 % животных от вируса гриппа. По-видимому, это объясняется индукцией неспецифического противовирусного иммунитета в ответ на введение аденовирусного вектора в организм животных.

Таким образом, продемонстрирована возможность формирования рекомбинантным аденовирусом, несущим ген гемагглютинаина вируса гриппа H5N2, гетеросубтипического иммунитета между субтипами H5N1 и H5N2 вируса гриппа.

Для проверки предположения об индукции у иммунизированных рекомбинантным аденовирусом мышей антител широкого спектра действия, способных нейтрализовать вирусы гриппа разных подтипов, относящихся к клайду H1 (H1, H2, H5, H6, H11, H13 и H16), нами были использованы вирусы A/USSR/90/77 (H1N1), относящиеся к данному клайду, и A/Aichi/2/68 (H3N2), не входящий в него. Согласно работе Throsby M. и коллег [14], гемагглютинины вирусов H5 и H1 имеют общий консервативный эпитоп, образованный аминокислотами His38, Gln40, Thr318 в HA1 субъединице гемагглютинаина и Ile45, Ile48, Thr49 и Val52 в HA2 субъединице гемагглютинаина, тогда как гемагглютинины вирусов H3 имеют в положениях 38 и 40 субъединицы HA1 вместо His и Gln Asn и Thr, соответственно, а в положениях 49 и 52 субъединицы HA2 вместо Thr и Val Asn и Leu, соответственно. Анализ аминокислотных последовательностей гемагглютининов вирусов гриппа штаммов A/USSR/90/77 (H1N1), A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), A/duck/Novosibirsk/56/2005 (H5N1), а также и A/Aichi/2/68 (H3N2), использованных в работе, показал, что указанные эпитопы гемагглютининов вирусов подтипов H1 и H5 имеют высокую степень гомологии. Только у штамма A/duck/Novosibirsk/56/2005 (H5N1) существует одна замена (в положении 40 Gln заменен на Val) (рис. 7). Тогда как у штамма A/Aichi/2/68 (H3N2) в данном эпитопе имеются существенные отличия от эпитопа, общего для вирусов гриппа первого клайда.

Было показано, что двукратная интраназальная иммунизация мышей аденовирусом Ad-NA5-2 приводит к индукции образования у них антител, специфичных к вирусу гриппа A/USSR/90/77 (H1N1). Уровень антител, препятствующих агглютинации эритроцитов вирусом гриппа H1N1 в сыворотках иммунизированных мышей, был достоверно отличен от уровня в сыворотке крови контрольных животных. При этом разница между уровнем антител в РТГА к вирусу гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в сыворотках крови иммунизированных мышей и уровнем неспецифического торможения гемагглютинации за счет компонентов сыворотки крови мышей была статистически не достоверна.

Для проверки протективных свойств рекомбинантного аденовируса Ad-NA5-2 против летальных доз (10 LD₅₀) вирусов гриппа A/USSR/90/77 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2) была проведена интраназальная двукратная иммунизация мышей. Показано, что иммунизация рекомбинантным аденовирусом позволила получить 100 % защиты против 10 LD₅₀ вируса гриппа A/USSR/90/77 (H1N1) и, напротив, защитила только 20 % мышей от 10 LD₅₀ вируса A/Aichi/2/68 (H3N2), что, скорее всего, произошло за счет вклада в защиту мышей неспецифического противовирусного иммунного ответа на введение в организм аденовирусного вектора.

ВЫВОДЫ

В результате проведенной работы впервые было показано, что доставка гена гемагглютинина вируса гриппа в составе аденовирусного вектора в клетки животных индуцирует протективный гетеросубтипический перекрестный иммунный ответ не только против вирусов гриппа внутри одного подтипа, но и против вирусов гриппа разных подтипов, относящихся к одному клайду.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что аденовирусные векторы могут служить универсальной платформой для получения вакцин как от сезонных, так и от пандемических штаммов вируса гриппа. ●

Работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (частично использованы средства по ГК № 02.512.11.2320). Выражаем глубокую благодарность академику РАМН Каверину Н.В. за постоянный интерес к работе, критические замечания и помощь в подготовке публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Benihoud K., Yeh P., Perricaudet M. // Curr. Opin. Biotechnol. 1999. V.10(5). P. 440–7.
2. Bett A.J., Prevec L.A., Graham F.L., et al. // J. Virol. 1983. V. 67. P. 5911–5921.
3. Hoelscher M.A., Singh N., Garg S. // J. Infect. Dis. 2008. V. 197(8). P. 1185–1188.
4. Kashyap A.K., Steel J., Oner A.F., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 22;105(16). P. 5986–91.
5. Корецкы-Бромберг S.A., Palese P. // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2009. V. 333. P. 243–67.
6. Lvov D.K. // Sov. Med. Rev. E. Virol. Rev. 1987. V. 2. P. 15–37.
7. Melidou A., Gioula G., Exindari M., Chatzidimitriou D., Diza-Mataftsi E. // Eurosurveillance. 2009. V. 14. Issue 20.
8. Shinde V., Bridges C.B., Uyeki T.M. // The new England journal of medicine. 2009. V. 360;25. P. 2616–2625.
9. Smirnov Y.A., Lipatov A.S., Van Beek R., et al. // Acta Virol. 2000. V. 44(1). P. 1–8.
10. Smirnov Y.A., Lipatov A.S., Gitelman A.K., Claas E.C., Osterhaus A.D. // Arch. Virol. 2000. V. 145(8). P. 1733–41.
11. Srivastava I.K., Margaret A.L. // Ann. Inten. Med. 2003. V. 138. P. 550–559.
12. Sui J., Hwang W.C., Perez S., et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2009. V. 16(3). P. 265–73.
13. Tang D.C., Zhang J., Toro H., Shi Z., Van Kampen K.R. // Expert Rev. Vaccines. 2009. V. 8(4). P. 469–81.
14. Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M., et al. // PLoS ONE. 2008. V. 3(12). Issue 12. P. 942.
15. Toro H., Tang D.C., Suarez D.L., Shi Z. // Vaccine. 2008. V. 26(21). P. 2640–2646.
16. Van Kampen K.R., Shi Z., Gao P., et al. // Vaccine. 2005. V. 23(8). P. 1029–36.
17. Webster R.G., Bean W.J., German O.T., et al. // Microbiol. Rev. 1992. V. 56. P. 152–179.
18. Луговцева В.Ю., Васильева Д.А. // Классификация и номенклатура вирусов зоонозных. Ульяновск. 2002. 268с.
19. Кочергин-Никитский К.С. // Анализ взаимодействия генов при скрещивании низкопатогенного вируса гриппа птиц подтипа H5 и высокопродуктивного штамма вируса гриппа человека. М., ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Иванковского РАМН. 2007.
20. Львов Д.К., Забережный А.Д., Алипер Т.И. // Природа. 2006. № 6.
21. Степанова Л.А., Мигунов А.И., Коротков А.В., Кузнецов О.К. // Медицинский академический журнал. 2006. Т. 6. № 4. С. 3–16.