

УДК 571.27

ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ CFP10-ESAT6 И CFP10-ESAT6-dIFN

© 2022 г. Е. А. Уварова¹, *, С. М. Розов¹, *, П. А. Белавин¹, Е. В. Дейнеко¹

¹ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, 630009 Россия

*e-mail: uvarova@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 23.06.2022 г.

После доработки 14.09.2022 г.

Принята к публикации 16.09.2022 г.

При разработке и создании кандидатных субъединичных рекомбинантных вакцин для профилактики туберкулеза в качестве перспективных антигенов применяют ранние секретируемые белки CFP10 и ESAT6 *Mycobacterium tuberculosis*, для которых характерна высокая иммуногенность. Для усиления иммуногенности таких кандидатных вакцин эффективным представляется подход введения к рекомбинантному белку дополнительных элементов с адьювантными свойствами. Ранее на модели туберкулеза у морских свинок нами показано, что при иммунизации животных рекомбинантным белком CFP10-ESAT6-dIFN формируется значительный защитный эффект. Теперь представлены результаты сравнительного анализа ответов CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих интерферон-γ (IFNγ), а также антительного ответа у мышей, иммунизированных рекомбинантными белками CFP10-ESAT6 и CFP10-ESAT6-dIFN. Установлено, что введение домена dIFN в состав рекомбинантного белка CFP10-ESAT6 приводит к снижению иммуногенности.

Ключевые слова: гуморальный ответ, рекомбинантный белок, Т-клеточный ответ, туберкулез, лимфоциты CD4⁺, лимфоциты CD8⁺, *Mycobacterium tuberculosis*, CFP10, ESAT6, dIFN

DOI: 10.56304/S0234275822060138

По данным Всемирной организации здравоохранения, за годы пандемии COVID-19 во всем мире выросли показатели смертности от туберкулеза, вызываемого *Mycobacterium tuberculosis*. Так, в общей популяции, не инфицированной вирусом иммунодефицита человека, показатели смертности от туберкулеза выросли с 1.2 млн в 2019 году до 1.3 млн в 2020 году, то есть достигли показателей 2017 года [1]. Следует подчеркнуть, что особенности этой инфекции, связанные с формированием штаммов *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью и латентными персистирующими формами в организме человека, требуют принятия неотложных мер и прежде всего разработки эффективных профилактических подходов [2–5].

Один из самых эффективных способов борьбы с туберкулезом, конечно, вакцинация. В настоящее время единственной противотуберкулезной

вакциной все еще остается бацилла Кальметта–Герена (вакцина БЦЖ), используемая для этих целей вот уже более 100 лет. Это живая аттенуированная бактерия *M. bovis* [6], которая в настоящее время представлена несколькими различными штаммами [7]. Вакцину БЦЖ в качестве профилактической применяют в педиатрической популяции, но она малоэффективна для взрослых, в особенности в случае туберкулеза легких – самой распространенной формы заболевания. Таким образом, необходимость создания новой вакцины для профилактики туберкулеза общепризнана и, несмотря на огромные усилия многочисленных групп исследователей, остается чрезвычайно актуальной [4, 5].

M. tuberculosis проникает в организм человека в основном через органы дыхания и становится внутриклеточным патогеном, у которого в ходе длительной эволюции выработалась эффективная стратегия ускользания от иммунного ответа хозяина. Микобактерия, захваченная макрофагом, может блокировать дальнейшее слияние фагосомы с лизосомой, модифицируя и приспособляя ее в качестве собственной среды обитания в инфицированном организме человека. Такие фагосомы получили специальное название – “фагосомы *Mycobacterium tuberculosis*”. Установлено, что деле-

Сокращения: CFP10 (10 kDa culture filtrate antigen) – белок культурального фильтрата; ESAT6 (6 kDa early secretory antigenic target) – ранний секреторный белок; МНС I (major histocompatibility complex I) – главный комплекс гистосовместимости I типа; МНС II (major histocompatibility complex II) – главный комплекс гистосовместимости II типа; PBS (phosphate buffered saline) – фосфатно-солевой буфер.

ние *M. tuberculosis* практически всегда происходит не в цитоплазме макрофага, а именно в фагосоме *M. tuberculosis* [8].

Важную роль в элиминации патогена при его проникновении в организм играют как врожденный, так и адаптивный иммунитет хозяина. Макрофаги, дендритные клетки и естественные киллеры выступают в качестве первой линии защиты от проникновения патогена в организм. Как антигенпрезентирующие макрофаги, так и дендритные клетки имеют огромное значение в фагоцитозе *M. tuberculosis*. Дендритные клетки, захватывая патоген, презентуют его пептиды на своей поверхности. Представленные таким образом пептиды *M. tuberculosis* распознаются Т-клетками CD4⁺ и CD8⁺ (Т-хелперами и цитотоксическими лимфоцитами) посредством молекул главных комплексов гистосовместимости I и II типов (МНС I и МНС II соответственно) [9, 10]. Для успешной защиты от патогена необходим одновременный скоординированный ответ Т-лимфоцитов CD4⁺, продуцирующих интерферон- γ (IFN γ), и цитотоксических Т-лимфоцитов CD8⁺, которые наряду с IFN γ продуцируют фактор некроза опухоли- α (TNF- α) и более 10 типов интерлейкинов [11]. Провоспалительные цитокины, секретируемые CD4⁺ Т-хелперами, повышают также активность макрофагов.

Понимание особенностей иммунного ответа хозяина на внедрение патогена – важное условие для успешной разработки эффективных вакцин против *M. tuberculosis*. По состоянию на 2021 год на разных стадиях клинических испытаний в качестве кандидатных находилось 14 вакцин как профилактического, так и терапевтического направления [1, 12]. Одним из очевидных подходов для повышения протективного эффекта разрабатываемой вакцины является активация как врожденного, так и приобретенного звеньев иммунитета за счет включения в состав вакцины элементов, обеспечивающих продукцию IFN γ [4, 13].

Белок *M. tuberculosis* ESAT6 и его шаперон CFP10, образующие гетеродимер и секретируемые на ранних стадиях заболевания, обладают высокой иммуногенностью и несут эпитопы, распознаваемые Т- и В-клетками больных туберкулезом [14]. Как показано нами ранее, рекомбинантный белок ESAT6 оказывает цитотоксическое действие на Т-лимфоциты [15]. Мы полагали, что слияние белка ESAT6 с CFP10 позволит, с одной стороны, повысить его иммуногенность в составе субъединичной вакцины, а с другой – снизить токсичность за счет возможных конформационных изменений в составе гибридного белка. Для формирования скоординированного ответа CD4⁺ и цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов гибридный белок CFP10-ESAT6 был дополнительно слит с дельтафероном [16, 17]. Дельтаферон (dIFN) представляет собой рекомбинантный мутантный аналог

человеческого IFN γ с повышенной растворимостью и устойчивостью к протеазам крови [18]. Рекомбинантный белок CFP10-ESAT6-dIFN, синтезируемый в тканях корнеплодов трансгенной моркови, а также наработанный в бактериальной системе экспрессии *Escherichia coli*, индуцировал как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ у лабораторных животных (мышей) при пероральном и инъекционном введении [16]. Следует подчеркнуть, что антигены *M. tuberculosis*, входящие в состав гибридного белка, не оказывали цитотоксического действия на мононуклеары периферической крови иммунизированных мышей. Защитный эффект рекомбинантного белка CFP10-ESAT6-dIFN продемонстрирован нами на морских свинках – после двукратной подкожной иммунизации и последующего заражения животных *M. tuberculosis* [17]. Представляло интерес оценить способность рекомбинантного белка CFP10-ESAT6-dIFN стимулировать ответы CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у иммунизированных животных.

Целью исследования было сравнение параметров иммуногенности гибридных белков CFP10-ESAT6 и CFP10-ESAT6-dIFN и оценка их влияния на формирование Т-клеточного и гуморального звеньев иммунитета на модели туберкулеза у мышей.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Получение и очистка рекомбинантных белков

Рекомбинантные белки, используемые в эксперименте (ESAT6, CFP10, dIFN, CFP10-ESAT6 и CFP10-ESAT6-dIFN), были синтезированы в прокариотической системе экспрессии *Escherichia coli* BL21(DE3). Фрагменты ДНК, кодирующие CFP10-ESAT6 и dIFN, были получены с помощью ПЦР из ранее сконструированной плазмиды pHis-cfp10-esat6-dIFN [16] с использованием праймеров, указанных в табл. 1.

Наработку и очистку белков CFP10-ESAT6-dIFN, CFP10-ESAT6 и dIFN проводили в соответствии с протоколом Wu и др. [19] с использованием Ni-NTA-агарозы (Qiagen, США). Для выделения и очистки белков CFP10 и ESAT6 использовали глутатион-сефарозу 4B (Pharmacia, Швеция). Соотношение молекулярных масс белков расчетным значениям проверяли электрофорезом в 14%-ном SDS-PAGE. Для дальнейших экспериментов полученные рекомбинантные белки использовали без удаления аффинной метки. Расчетные молекулярные массы белков составили: ESAT6 – 6 кДа; CFP10 – 10 кДа; dIFN – 20 кДа; CFP10-ESAT6 – 16 кДа и CFP10-ESAT6-dIFN – 36 кДа. Молекулярная масса GST-метки составила 26 кДа, 6 \times His-метки – 1 кДа.

Таблица 1. Праймеры, использованные для проведения ПЦР гибридных генов**Table 1.** Oligonucleotides used for PCR of hybrid genes

| Ген | Праймер, 5'→3' | | Рестриктаза |
|--------------------|----------------|---|-----------------|
| <i>cfp10-esat6</i> | For | CCCGGATCC ATGGCAGAGATGAAGACCG | <i>Bam</i> HI |
| | Rev | CCCAAGCTT ATG CGAACATCCCAGTGACG | <i>Hind</i> III |
| <i>dIFN</i> | For | CCCAGATCTATGCAGGACCCATATGTAAAAG | <i>Bgl</i> II |
| | Rev | CCCAAGCTT ACT GGGATGCTCTTCGACCTC | <i>Hind</i> III |

* *Примечание:* Жирным шрифтом выделены сайты эндонуклеаз рестрикции, указанных в следующем столбце; For – прямой праймер, Rev – обратный праймер.

* *Note* The sites of the restriction endonucleases indicated in the next column are shown in bold; For is a forward primer; Rev is a reverse one.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности синтетических пептидов, использованных для стимуляции лимфоцитов *in vitro***Table 2.** Amino acid sequences of synthetic peptides used to stimulate lymphocytes *in vitro*

| Пептид | Последовательность |
|-------------------------|--------------------|
| ESAT-6 _{1–17} | MTEQQWNFAGIEAAASA |
| ESAT-6 _{15–29} | ASAIQGNVTSIHSL |
| CFP10 _{38–55} | SLQGQWRGAAGTAAQAAV |
| CFP10 _{72–86} | ISTNIRQAGVQYSRA |

Дизайн пептидов

Для оценки иммунного ответа спленоцитов *in vitro* были сконструированы пептиды (табл. 2) на основе Т-клеточных эпитопов белков CFP10 и ESAT6 *M. tuberculosis* с использованием базы данных иммунных эпитопов (www.iedb.org).

Несмотря на то, что ранние секреторные белки ESAT6 и CFP10 *M. tuberculosis* имеют небольшие размеры, некоторые их области охарактеризованы как эпитопы, опознаваемые CD4 и CD8 Т-клетками [19]. Сконструированные пептиды, представляющие собой эпитопы CFP10 и ESAT6, распознаваемые МНС II мыши, были синтезированы фирмой Biomatic (США). Синтетические пептиды растворяли в 10%-ном ДМСО, разводили фосфатно-солевым буфером (PBS) до конечной концентрации 5 мг/мл и хранили при –20°C.

Иммунизация животных

Для иммунизации использовали самок мышей линии C57BL/6 в возрасте 10 недель, полученных из ЦКП “Виварий конвенциональных животных” Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Животных содержали в стандартных условиях: освещение 12/12 ч (свет/темнота), температура воздуха 23–24°C, гранулированный корм и вода без ограничений. Опыты на животных были одобрены Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 36 от 28.04.2017).

Всего в эксперименте использовано 20 мышей, по пять особей в каждой группе. Животным

первых трех групп в заднюю конечность вводили внутримышечно рекомбинантные белки CFP10-ESAT6, CFP10-ESAT6-dIFN или dIFN (0.5 мкг/животное в 100 мкл PBS) на первые, 14 и 27 сутки после начала эксперимента. Контрольную группу составляли животные, которым вводили по аналогичной схеме 100 мкл PBS (отрицательный контроль). Группа животных, которым вводили рекомбинантный dIFN, рассматривалась в качестве положительного контроля.

Выделение спленоцитов, стимуляция *in vitro* и проточная цитометрия

На седьмые сутки после завершения иммунизации животных подвергали декапитации с последующим извлечением селезенки и сбором всей крови для выделения сыворотки. Селезенку извлекали в асептических условиях и помещали в питательную среду RPMI-1640 (Lonza, Швейцария): 2 mM L-глутамин, 80 мг/л гентамицин и 5% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS) – для дальнейшего выделения спленоцитов.

Для получения спленоцитов селезенку от каждого животного отдельно измельчали с помощью ножниц с последующим фильтрованием через сито с диаметром пор 40 мкм. Для удаления эритроцитов смесь помещали кратковременно (5 с) в стерильную деионизованную воду, промывали трижды путем добавления среды RPMI-1640 (Lonza) с L-глутамином (Biolor, Швейцария) и гентамицином и последующим суспендированием в этой же среде с добавлением 10% FBS (HyClone, Thermo

Fisher Scientific, США). Подготовленные спленоциты (1.5×10^6 клеток/мл) помещали в 24-луночные планшеты Nunc Nunclon Delta (Thermo Fisher Scientific). Для стимуляции иммунного ответа в лунки добавляли либо смесь четырех синтетических пептидов (Biomatic) (табл. 2), либо отдельные рекомбинантные белки CFP10 и ESAT6 из расчета 1 мкг/мл. Спленоциты инкубировали в течение 18–20 ч в атмосфере 5% CO_2 при 37°C. За пять часов до окончания инкубации к спленоцитам добавляли брэфельдин А в концентрации 5 мкг/мл (Biolegend, США). В качестве положительного контроля использовали неспецифическую стимуляцию смесью 20 нг/мл фитогемаглютинаина и 1 нг/мл иономицина (Sigma, США) в течение 5 ч в присутствии брэфельдина А. Спленоциты без неспецифической стимуляции с добавлением только брэфельдина А использовали как отрицательный контроль.

Окраску, отмывку и проточную цитометрию проводили с применением буфера для окрашивания (Biolegend). Для выявления поверхностных маркеров (CD4^+ и CD8^+) и внутриклеточных цитокинов использовали моноклональные антитела (Biolegend), меченные PE/Cy5 (для выявления CD4^+), PE/Cy7 (для CD8^+), FITC (для $\text{IFN}\gamma$) и PE (для интерлейкина-4 (IL-4) мыши). Для окрашивания внутриклеточных цитокинов использовали отмывочный буфер для пермеабиллизации (Biolegend). Для оценки жизнеспособности спленоцитов применяли окрашивание йодидом пропидия (Biolegend). На проточном цитометре BD FACS-Canto II (BD Biosciences, США) для каждого образца проанализировано не менее 10^5 клеток.

Иммуноферментный анализ

В сыворотках крови, полученных от экспериментальных и контрольных животных, определяли титры специфических антител к белкам CFP10 и ESAT6 *M. tuberculosis*, а также к dIFN. Рекомбинантные белки CFP10, ESAT6 и dIFN, взятые в концентрации 1 мкг/мл в PBS, наносили на полистирольные планшеты (Greiner Bio-One, Австралия) в расчете 100 мкл/лунка. После инкубации и отмывки свободную поверхность лунок блокировали 5%-ным раствором молока в PBS, содержащем 0.1% Tween 20. Сыворотки разводили PBS в 50, 400, 800 и 3200 раз и вносили в лунки отмытого планшета (по 3 лунки на каждое разведение). Для визуализации использовали козы антитела против IgG мыши (anti-mouse IgG (H+L)), конъюгированные с пероксидазой хрена (Abcam, Великобритания), и ТМВ (Abcam) в качестве субстрата пероксидазы. Оптическую плотность измеряли на ридере для микропланшетов Victor X3 2030 (Perkin Elmer, США) при длине волны 450 нм.

Статистический анализ

Данные проточной цитометрии представлены средними значениями \pm стандартное отклонение (SD); данные иммуноферментного анализа представлены в виде диаграмм, показывающих средние, минимальные и максимальные значения. Для анализа межгрупповых различий в доле цитокинпродуцирующих лимфоцитов использовали двухфакторный дисперсионный анализ с множественными тестами сравнения (программный пакет GraphPad Prism). Различия в титрах антител в сыворотках иммунизированных животных оценивали методом однократного дисперсионного анализа с множественными тестами сравнения (GraphPad Prism). Подробное статистическое описание множественных сравнений можно найти в работе С. Розова (S. Rozov) и др. [20]. Уровень достоверности (α) составил 0.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование рекомбинантных пептидов или белков в качестве иммуногенов считается одним из наиболее перспективных альтернативных направлений создания кандидатных противотуберкулезных вакцин по сравнению с традиционными подходами, основанными на цельных (инактивированных или аттенуированных) возбудителях инфекции [3]. При проектировании таких субъединичных вакцин для индукции сильного иммунного ответа на *M. tuberculosis* необходимо использовать эпитопы, опознаваемые как хелперными Т-лимфоцитами, связывающимися с МНС II, так и цитотоксическими, связывающимися с молекулами МНС I [21, 22]. При оценке параметров иммуногенности исследуемого рекомбинантного белка в сыворотках крови животных, иммунизированных CFP10-ESAT6 и CFP10-ESAT6-dIFN, была использована технология пептид-МНС-мультимеров, позволяющая визуализировать Т-лимфоциты и определять их количество с точностью до одной клетки [23, 24].

Т-клеточный ответ оценивали по доле цитокинпродуцирующих лимфоцитов в общем количестве CD8^+ и CD4^+ Т-клеток после стимуляции. При анализе данных проточной цитометрии использовали следующую логическую стратегию гейтирования: синглеты \rightarrow лимфоциты \rightarrow (CD4^+ или CD8^+) \rightarrow ($\text{IFN}\gamma^+$ или IL-4^+). Неспецифическая стимуляция лимфоцитов *in vitro* подтвердила способность этих клеток реагировать на стимуляцию. На рис. 1 представлены результаты сравнительного анализа продуцирования $\text{IFN}\gamma$ Т-лимфоцитами CD8^+ в образцах спленоцитов, выделенных из селезенки исследуемых групп мышей, иммунизированных рекомбинантными белками CFP10-ESAT6-dIFN или CFP10-ESAT6 (рис. 1а). Кроме того, показаны результаты сти-

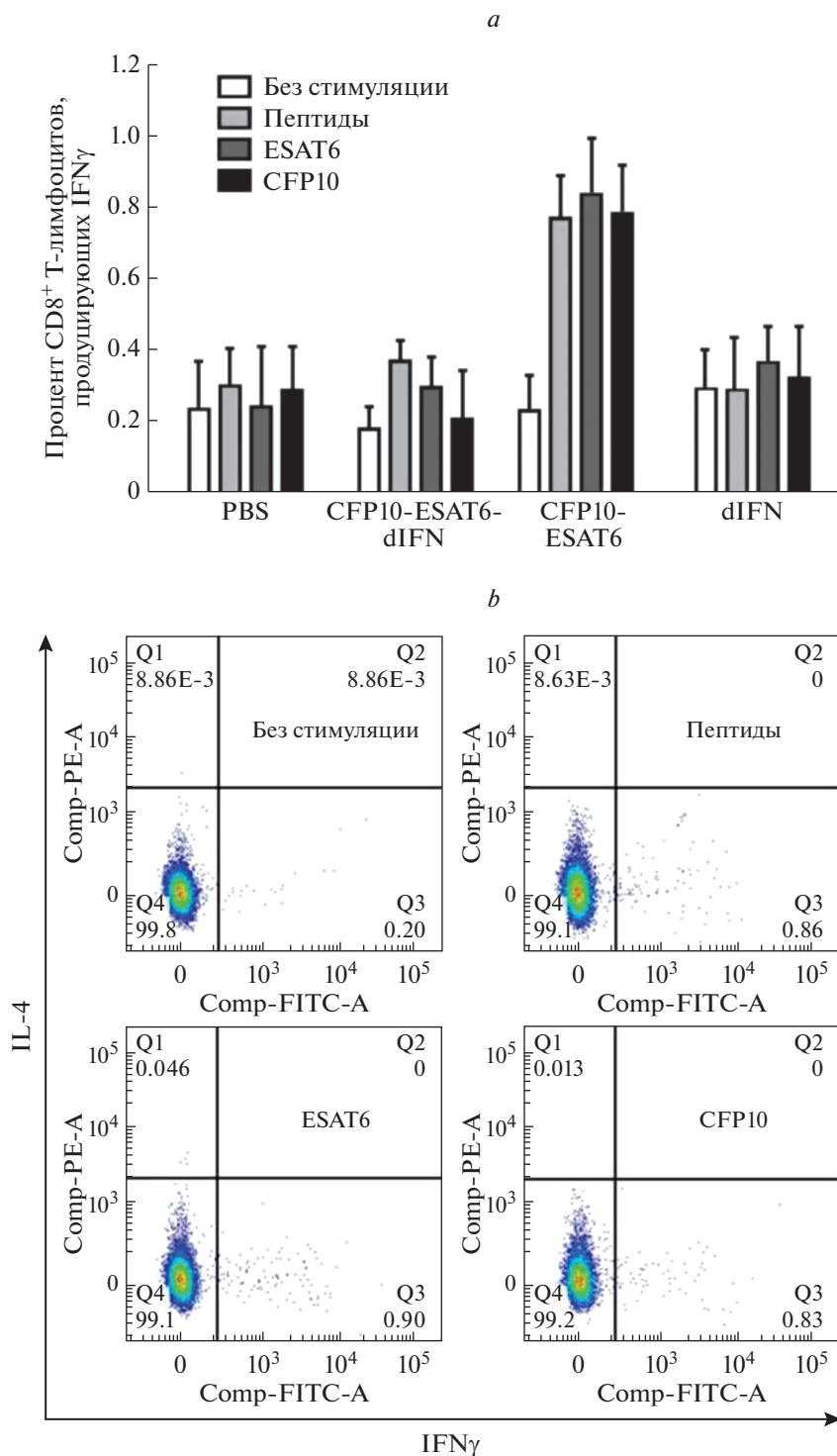


Рис. 1. Сравнительный анализ способности рекомбинантных белков CFP10-ESAT6 и CFP10-ESAT6-dIFN индуцировать образование CD8 $^+$ Т-лимфоцитов у иммунизированных животных. *a* – Продукция IFN γ Т-лимфоцитами CD8 $^+$ мышей, иммунизированных белками CFP10-ESAT6-dIFN, CFP10-ESAT6 или dIFN, в ответ на стимуляцию смесью пептидов, CFP10 или ESAT6 *in vitro* ($n = 5$). Результаты представлены как процент лимфоцитов, продуцирующих IFN γ , от общей популяции лимфоцитов. *b* – Стимуляция *in vitro* CD8 $^+$ Т-лимфоцитов в образце спленоцитов мышей. Здесь и далее: PBS – отрицательный контроль; dIFN – положительный контроль. $p < 0.05$.

Fig. 1. Comparative analysis of the ability of recombinant proteins CFP10-ESAT6 and CFP10-ESAT6-dIFN to induce the formation of CD8 $^+$ T lymphocytes in immunized animals. *a* – Production of IFN γ by CD8 $^+$ T lymphocytes of mice immunized with CFP10-ESAT6-dIFN, CFP10-ESAT6 or dIFN in response to stimulation with a mixture of peptides, CFP10 or ESAT6 *in vitro* ($n = 5$). Results are presented as the percentage of IFN γ -producing lymphocytes of the total lymphocyte population *b* – *In vitro* stimulation of CD8 $^+$ T cells in a mouse splenocyte sample. Hereinafter: PBS, negative control; dIFN, positive control. $p < 0.05$.

муляции *in vitro* CD8⁺ Т-лимфоцитов в спленоцитах мышей, иммунизированных CFP10-ESAT6 (рис. 1b).

Как видно из рис. 1a, продукция IFN γ Т-лимфоцитами CD8⁺ отмечена только в спленоцитах, выделенных из селезенок мышей, иммунизированных рекомбинантным CFP10-ESAT6. У животных этой группы в спленоцитах, стимулированных синтетическими пептидами или рекомбинантными белками ESAT6 и CFP10, наблюдалось статистически значимое ($p < 0.0001$) увеличение доли CD8⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN γ . Показатели по экспрессии IFN γ Т-лимфоцитами CD8⁺ в спленоцитах мышей, иммунизированных CFP10-ESAT6-dIFN, соответствовали таковым для контрольных групп (PBS – отрицательный контроль; dIFN – положительный контроль).

Следовательно, введение в молекулу рекомбинантного белка CFP10-ESAT6 дополнительного домена, а именно dIFN человека, снижало его иммуногенность. Среди спленоцитов, выделенных из селезенок мышей, иммунизированных рекомбинантным белком CFP10-ESAT6-dIFN, не выявлено статистически значимой доли Т-лимфоцитов CD8⁺, продуцирующих IFN γ в ответ на специфическую стимуляцию антигенами *M. tuberculosis in vitro* (рис. 1a). На рис. 1b показана стимуляция продукции IFN γ (Th1-ответ, сектор Q3) при низкой продукции IL-4 (Th2-ответ, сектор Q1). Как видно из приведенных результатов, в группе мышей, иммунизированных рекомбинантным CFP10-ESAT6, количество Т-лимфоцитов CD8⁺, продуцирующих IFN γ , было сопоставимо при всех вариантах стимуляции.

Аналогичные результаты получены в серии экспериментов по оценке способности белка CFP10-ESAT6-dIFN к индукции CD4⁺ Т-лимфоцитов у иммунизированных животных (рис. 2). Статистически значимое увеличение доли CD4⁺ Т-клеток, специфичных к антигенам *M. tuberculosis*, выявлено только для группы животных, иммунизированных белком CFP10-ESAT6 (рис. 2a). На рис. 2b показана стимуляция продукции IFN γ (Th1-ответ, сектор Q3) при низкой продукции IL-4 (Th2-ответ, сектор Q1). Иммунизация животных белком CFP10-ESAT6 стимулировала преимущественно субпопуляцию CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих IFN γ (Th1-ответ), тогда как доля IL-4-продуцирующих CD4⁺ Т-лимфоцитов (Th2-ответ) оставалась крайне низкой (<0.05%) независимо от типа иммунизации и последующей стимуляции (рис. 2b).

На рис. 3 представлены результаты оценки титров антител IgG против белков CFP10, ESAT6 и dIFN в сыворотках животных, иммунизированных рекомбинантными белками CFP10-ESAT6 и CFP10-ESAT6-dIFN. Исследования проводили

при разведении сывороток крови иммунизированных животных в диапазоне от 1 : 50 до 1 : 3200. Статистически значимое увеличение титра антител в сыворотках животных выявлено только для антигена ESAT6. Следует отметить, что у животных, иммунизированных белком CFP10-ESAT6, ESAT6-специфические антитела выявляли при максимальном разведении (1 : 3200), тогда как при иммунизации CFP10-ESAT6-dIFN – только до разведения сыворотки 1 : 400. Титры анти-CFP10-антител превышали контрольные значения, но были не выше 1/400 и статистической значимости не имели. Антитела к рекомбинантному dIFN регистрировали только при низком разведении сывороток (1 : 50), что было сопоставимо с отрицательным контролем, то есть с неспецифическим связыванием исследуемого белка.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что при иммунизации животных исследованными рекомбинантными белками: CFP10-ESAT6-dIFN, CFP10-ESAT6 – высокие титры антител формируются только к ESAT6. Введение dIFN в молекулу CFP10-ESAT6 снижает иммуногенность последнего. Это может быть связано с экранированием части В-эпитопов ESAT6. Однако ранее нами показано [16], что иммунизация мышей белком CFP10-ESAT6-dIFN индуцировала более высокие титры анти-ESAT6-антител по сравнению с иммунизацией рекомбинантным ESAT6. Более того, включение dIFN в состав рекомбинантного CFP10-ESAT6 с получением CFP10-ESAT6-dIFN приводило к снижению цитотоксичности [16]. Ранее на модели туберкулеза у морских свинок мы установили [17], что иммунизация белком CFP10-ESAT6-dIFN эффективно защищала животных от заражения *M. tuberculosis*. Мы предполагаем, что протективный эффект обусловлен присутствием домена dIFN – аналога IFN γ человека. Важная роль IFN γ в активации макрофагов, необходимых для элиминации *M. tuberculosis*, отмечена в ряде исследований [25–27]. Перспективность использования CFP10-ESAT6, слитого с белком Ag85b *M. tuberculosis*, в качестве кандидатной вакцины для борьбы с латентной формой туберкулеза продемонстрирована на морских свинках [28].

Следует подчеркнуть, что среди огромного числа разрабатываемых кандидатных противотуберкулезных вакцин именно субъединичные вакцины рассматриваются как наиболее перспективные с точки зрения безопасности и нацеленности на антигены *M. tuberculosis*. Однако низкий уровень иммуногенности рекомбинантных белков или пептидов, входящих в состав таких вакцин, нуждается в его усилении за счет адьювантов или препаратов, повышающих иммуногенность субъединичной кандидатной вакцины [29]. Выбор адьювантов, как правило, диктуется их способностью усиливать иммуногенность вакцины и в

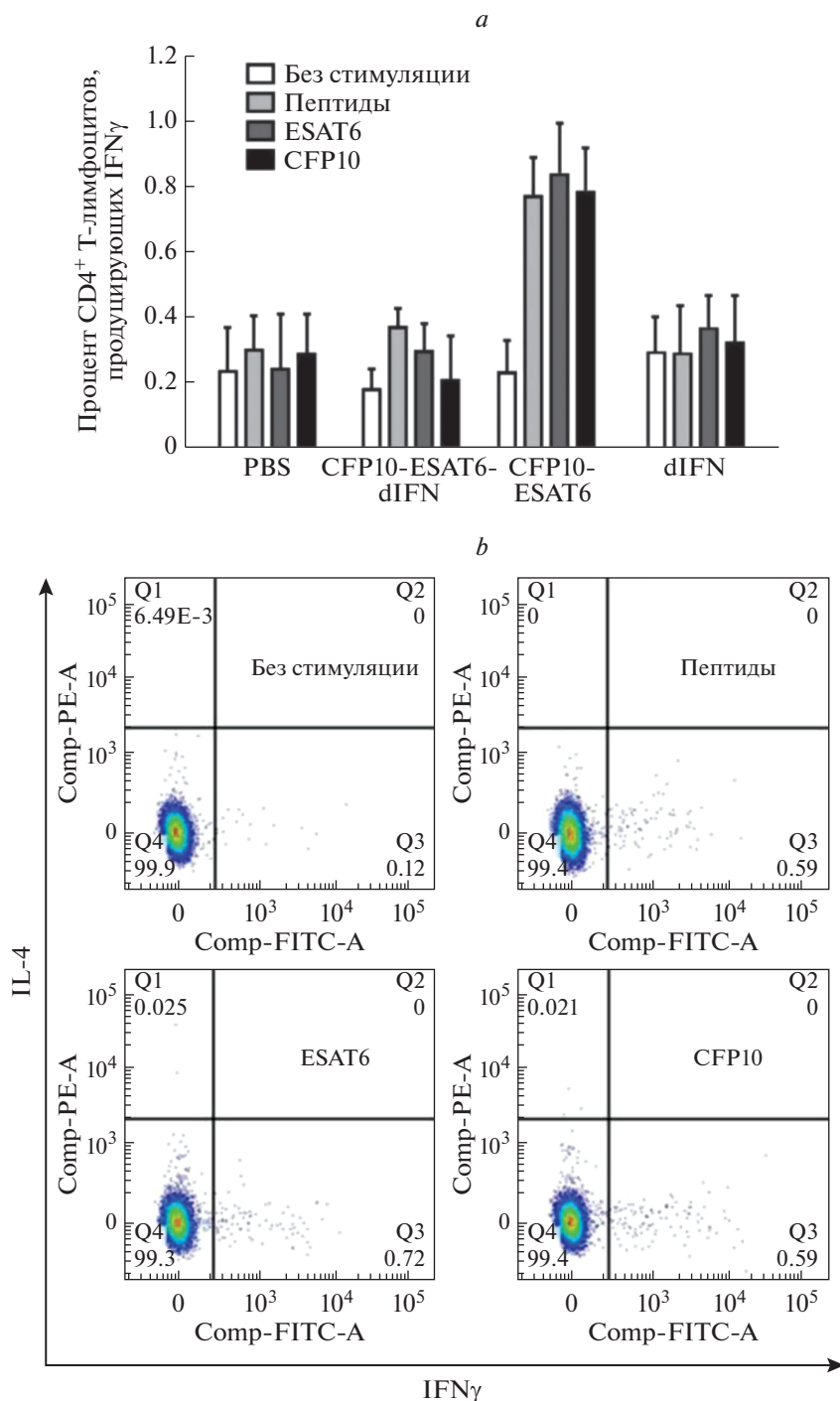


Рис. 2. Сравнительный анализ способности рекомбинантных белков CFP10-ESAT6 и CFP10-ESAT6-dIFN индуцировать продукцию CD4 $^+$ Т-лимфоцитов у иммунизированных животных. *a* – Продукция IFN γ Т-лимфоцитами CD4 $^+$ мышей, иммунизированных белками CFP10-ESAT6-dIFN, CFP10-ESAT6 или dIFN, в ответ на стимуляцию смесью пептидов, CFP10 или ESAT6 *in vitro* ($n = 5$). Результаты представлены как процент лимфоцитов, продуцирующих IFN γ , от общей популяции лимфоцитов. *b* – Стимуляция *in vitro* Т-лимфоцитов CD4 $^+$ в образце спленоцитов мышей. $p < 0.05$.

Fig. 2. Comparative analysis of the ability of recombinant proteins CFP10-ESAT6 and CFP10-ESAT6-dIFN to induce the formation of CD4 $^+$ T lymphocytes in immunized animals. *a* – Production of IFN γ by CD4 $^+$ T lymphocytes of mice immunized with CFP10-ESAT6-dIFN, CFP10-ESAT6 or dIFN in response to stimulation with a mixture of peptides, CFP10 or ESAT6 *in vitro* ($n = 5$). Results are presented as percentage of IFN γ -producing lymphocytes of the total lymphocyte population. *b* – *In vitro* stimulation of CD4 $^+$ T lymphocytes in a mouse splenocyte sample. $p < 0.05$.

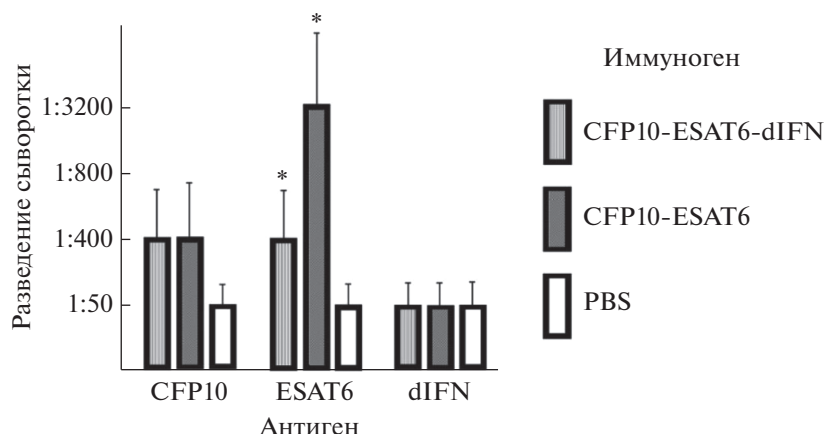


Рис. 3. Титры антител против CFP10, ESAT6 и dIFN в сыворотках крови мышей, иммунизированных белками CFP10-ESAT6-dIFN, CFP10-ESAT6, и в контрольной группе (PBS). Число мышей во всех группах одинаково ($n = 5$); $*p < 0.05$.
Fig. 3. Antibody titers against CFP10, ESAT6, and dIFN in the blood sera of mice immunized with CFP10-ESAT6-dIFN, CFP10-ESAT6, and in the control group (PBS). The number of mice in all groups is the same ($n = 5$); $*p < 0.05$

первую очередь связан с усилением иммуногенности антигенов *M. tuberculosis* [31]. Решающее значение для защиты против *M. tuberculosis*, по мнению некоторых исследователей, имеет активация клеточного звена иммунитета, связанного с выработкой $IFN\gamma$ [30, 31]. Разработан сервер IFN-эпитопов, предназначенный для предсказания на основе аминокислотной последовательности белка эпитопов, которые могут индуцировать $CD4^+$ Т-клетки, секретирующие $IFN\gamma$ [13].

По результатам проведенного нами исследования, введение домена dIFN в молекулу, состоящую из двух антигенов *M. tuberculosis*: CFP10 и ESAT6 — не индуцировало ни $CD4^+$, ни $CD8^+$ Т-клеточного ответа, тогда как для группы животных, иммунизированных рекомбинантным белком CFP10-ESAT6, наблюдалось статистически значимое увеличение доли $CD4^+$ Т-клеток, специфичных к антигенам *M. tuberculosis*. Согласно полученным ранее результатам, именно введение домена dIFN в молекулу CFP10-ESAT6 приводило к снижению цитотоксичности последнего и защите от заражения высоковирулентным штаммом H37Rv *M. tuberculosis* иммунизированных морских свинок [16, 17]. По сравнению с контрольной группой у иммунизированных животных не только не развивались симптомы острого туберкулеза, но наблюдалась и прибавка в весе. Во внутренних органах иммунизированных животных регистрировали минимальные морфологические изменения и незначительные воспалительные поражения в ткани печени, что соответствовало снижению бактериальной нагрузки в селезенке и среднего количества *M. tuberculosis* в макрофагах [17].

Предположение о возможной экранизации некоторых эпитопов в белке CFP10-ESAT6-dIFN косвенно подтверждается данными по конкуренции

между эпитопами в полноразмерном белке ESAT6, используемом для иммунизации. Так, делетирование первых 15 аминокислотных остатков из последовательности ESAT6 (Delta15ESAT-6) сопровождалось усилением защитной реакции на заражение у животных, иммунизированных делетированным вариантом по сравнению с полноразмерным ESAT6 [32]. По результатам испытания рекомбинантной вакцины, включающей три клеточных эпитопа ESAT6, она индуцировала более высокие уровни $IFN\gamma$ и IL-12 по сравнению полноразмерным ESAT6 и более эффективно защищала животных от заражения *M. tuberculosis* [33].

Тот факт, что выявленная конкуренция между эпитопами ESAT6 может ослаблять способность узнавать другие эпитопы молекулами МНС [32], послужил толчком к развитию новой стратегии создания противотуберкулезных кандидатных вакцин на основе синтетических длинных пептидов, которые могут не только улучшать иммуногенность и протективную активность, но и ослаблять неблагоприятные эффекты некоторых эпитопов [22]. Основные направления работ в современной вакцинологии при разработке рекомбинантных пептидных противотуберкулезных вакцин представлены в обзоре W. Gong и соавт. [3]. Задачи разработчиков включают такие операции, как определение протективных антигенов, предсказание Т- и В-клеточных эпитопов с выбором среди них иммунодоминантных, а также отбор адьювантов. Разработке противотуберкулезной полиэпитопной мРНК-вакцины на основе белков *M. tuberculosis*, участвующих в модификации эпитома хозяина, посвящен обзор H. Al Tbeishat [34]. Перспективность объединения рекомбинантных субъединичных вакцин, в том числе полиэпитопных, с БЦЖ поддержана авторами нескольких

обзоров [4, 35, 36]. Организовано GMP-производство субъединичной вакцины H107, включающей 8 эпитопов *M. tuberculosis*, в рамках подготовки клинических испытаний при совместном введении с БЦЖ [37].

На сегодняшний день вакцинация считается одним из наиболее эффективных методов профилактики инфекционных заболеваний, в том числе и туберкулеза. Со времени старта международной программы “The Stop Tuberculosis”, которая была инициирована в 2006 году, в результате усилий многочисленных коллективов исследователей ведущих лабораторий различных стран разработано огромное число кандидатных вакцин против *M. tuberculosis*, часть из которых (14 вакцин) в настоящее время находится на различных стадиях клинических испытаний. Наряду с традиционными подходами на передний план в исследованиях выходят альтернативные стратегии, направленные на поиск наиболее эффективных искусственных иммуногенов. Перспективным представляется и создание кандидатных вакцин, объединяющих традиционные и современные подходы, например одновременное использование БЦЖ и полиэпитопных субъединичных вариантов на основе *M. tuberculosis*. Проведенные нами исследования показали, что рекомбинантный белок CFP10-ES-AT6-dIFN, хотя и уступает по иммунологическим характеристикам CFP10-ESAT6, но при этом не лишен преимуществ по другим параметрам: сниженной цитотоксичности *in vitro* и повышенной протективной активности *in vivo*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования (грант № FWNR-2022-0022).

Авторы внесли равный вклад.

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Работа с лабораторными животными выполнена с соблюдением норм Хельсинской декларации 1964 года и ее последующих модификаций и одобрена Комитетом по этике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 36 от 28.04.2017).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO. Global Tuberculosis Report 2021. Geneva: Geneva: World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>
2. Розов С.М., Попова Н.А., Дейнеко Е.В. Иммуитет против *Mycobacterium tuberculosis*: стратегии напа-

дения и защиты. *Успехи современной биологии*, 2016, 136(2), 156–172.

3. Gong W., Pan C., Cheng P., Wang J., Zhao G., Wu X. Peptide-based vaccines for tuberculosis. *Front. Immunol.*, 2022, 13, 830497. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.830497>
4. Kaufmann S.H.E. Vaccination against tuberculosis: re-vamping BCG by molecular genetics guided by immunology. *Front. Immunol.*, 2020, 11, 316. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00316>
5. Afkhami S., Villela A.D., D’Agostino M.R., Jeyanathan M., Gillgrass A., Xing Z. Advancing immunotherapeutic vaccine strategies against pulmonary tuberculosis. *Front. Immunol.*, 2020, 11, 557809. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.557809>
6. Aspatwar A., Gong W., Wang S., Wu X., Parkkila S. Tuberculosis vaccine BCG: the magical effect of the old vaccine in the fight against the COVID-19 pandemic. *Int. Rev. Immunol.*, 2021, 14(22), 283–296. <https://doi.org/10.1080/08830185.2021.1922685>
7. da Silva A.S.M., Albuquerque L.H.P., de Ponte C.G.G., de Almeida M.R., de Faria S.E.R., Ribeiro M.D.S., Pereira E.N.G.D.S., Antas P.R.Z. Time to face the proofs: the BCG Moreau vaccine promotes superior inflammatory cytokine profile *in vitro* when compared with Russia, Pasteur, and Danish strains. *Hum. Vaccin Immunother.*, 2022, 31(18), 1989913. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1989913>
8. Ufimtseva E., Ereemeeva N., Bayborodin S., Umpeleva T., Vakhrusheva D., Skorniyakov S. *Mycobacterium tuberculosis* with different virulence reside within intact phagosomes and inhibit phagolysosomal biogenesis in alveolar macrophages of patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*, 2019, 114, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.12.002>
9. Ernst J.D. Mechanisms of *M. tuberculosis* immune evasion as challenges to TB vaccine design. *Cell Host Microbe*, 2018, 24(1), 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.004>
10. Gong W., Wu X. Differential diagnosis of latent tuberculosis infection and active tuberculosis: a key to a successful tuberculosis control strategy. *Front. Microbiol.*, 2021, 12, 745592. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.745592>
11. Abebe F. Synergy between Th1 and Th2 responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection: a review of current understanding. *Int. Rev. Immunol.*, 2019, 38(4), 172–179. <https://doi.org/10.1080/08830185.2019.1632842>
12. Dockrell H.M., McShane H. Tuberculosis vaccines in the era of Covid-19 – what is taking us so long? *eBioMedicine*, 2022, 79(8), 30. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103993>
13. Dhanda S.K., Vir P., Raghava G.P. Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders. *Biol. Direct*, 2013, 8, 30. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-8-30>

14. Amor Y.B., Shashkina E., Johnson S., Bifani P.J., Kurepina N., Kreiswirth B., Bhattacharya S., Spencer J., Rendon A., Catanzaro A., Gennaro M.L. Immunological characterization of novel secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand. J. Immunol.*, 2005, 61, 139–146.
<https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2005.01557.x>
15. Uvarova E.A., Belavin P.A., Permyakova N.V., Zagorskaya A.A., Nosareva O.V., Kakimzhanova A.A., Deineko E.V. Oral immunogenicity of plant-made *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 and CFP10. *Biomed. Res. Int.*, 2013, 2013, 316304.
<https://doi.org/10.1155/2013/316304>
16. Permyakova N.V., Zagorskaya A.A., Belavin P.A., Uvarova E.A., Nosareva O.V., Nesterov A.E., Novikovskaya A.A., Zav'yalov E.L., Moshkin M.P., Deineko E.V. Transgenic carrot expressing fusion protein comprising *M. tuberculosis* antigens induces immune response in mice. *Biomed. Res. Int.*, 2015, 2015, 417565.
<https://doi.org/10.1155/2015/417565>
17. Permyakova N.V., Belavin P.A., Pirozhkova D.S., Ufimtseva E.G., Rozov S.M., Mursalimov S.R., Sidorchuk Y.V., Uvarova E.A., Zagorskaya A.A., Marenkova T.V., Bannikova S.V., Demidov E.A., Starostin K.V., Kravchenko M.A., Vakhrusheva D.V., Berdnikov R.B., Ereemeeva N.I., Skorniyakov S.N., Peltek S.E., Deineko E.V. The recombinant fusion protein CFP10–ESAT6–dIFN has protective effect against tuberculosis in guinea pigs. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 2018, 65, 39–58.
<https://doi.org/10.1556/030.65.2018.006>
18. Татков С.И., Смирнова О.Ю., Цивковский Р.Ю., Кочнева Г.В., Кузьмичева Г.А., Христофоров В.С., Косарев И.С., Черных Е.Р., Хонина Н.А., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д., Фадинова В.А., Пустошилова Н.М., Масычева В.И., Сандахчиев Л.С. Мутантный γ -интерферон человека с укороченным С-концом и его свойства. *Докл. РАН*, 2000, 372(6), 833–835.
19. Wu X., Yang Y., Zhang J., Li B., Liang Y., Zhang C., Dong M. Comparison of antibody responses to seventeen antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Chim. Acta*, 2010, 411(19–20), 1520–1528.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.06.014>
20. Rozov S.M., Deineko E.V., Deyneko I.V. Flower Morphology: fully automatic flower morphometry software. *Planta*, 2018, 247, 1163–1173.
<https://doi.org/10.1007/s00425-018-2856-3>
21. Rai P.K., Chodisetti S.B., Maurya S.K., Nadeem S., Zeng W., Janmeja A.K., Jackson D.C., Agrewala J.N. A lipidated bi-epitope vaccine comprising of MHC-I and MHC-II binder peptides elicits protective CD4 T cell and CD8 T cell immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Transl. Med.*, 2018, 16(1), 279.
<https://doi.org/10.1186/s12967-018-1653-x>
22. Horváti K., Pályi B., Henczkó J., Balka G., Szabó E., Farkas V., Biri-Kovács B., Szeder B., Fodor K.A. A convenient synthetic method to improve immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* related T-cell epitope peptides. *Vaccines (Basel)*, 2019, 7(3), 101.
<https://doi.org/10.3390/vaccines7030101>
23. Altman J.D., Moss P.A., Goulder P.J., Barouch D.H., McHeyzer-Williams M.G., Bell J.I., McMichael A.J., Davis M.M. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 1996, 274, 94–96.
<https://doi.org/10.1126/science.274.5284.94>
24. Meidenbauer N., Hoffmann T., Donnenberg A.D. Direct visualization of antigen-specific T cells using peptide-MHC-class I tetrameric complexes. *Methods*, 2003, 31, 160–171.
[https://doi.org/10.1016/s1046-2023\(03\)00126-9](https://doi.org/10.1016/s1046-2023(03)00126-9)
25. Wang X., Zhang J., Liang J., Zhang Y., Teng X., Yuan X., Fan X. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection offered by a new multistage subunit vaccine correlates with increased number of IFN- γ ⁺IL-2⁺CD4⁺ and IFN- γ ⁺CD8⁺ T cells. *PLoS One*, 2015, 30(10), e0122560.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122560>
26. Sable S.B., Kalra M., Verma I., Khuller G.K. Tuberculosis subunit vaccine design: the conflict of antigenicity and immunogenicity. *Clin. Immunol.*, 2007, 122(3), 239–251.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.10.010>
27. da Costa A.C., Resende D.P., Santos B.P.O., Zoccal K.F., Faccioli L.H., Kipnis A., Junqueira-Kipnis A.P. Modulation of macrophage responses by CMX, a fusion protein composed of Ag85c, MPT51, and HspX from *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Microbiol.*, 2017, 8, 623.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00623>
28. Wang C., Lu J., Du W., Wang G., Li X., Shen X., Su C., Yang L., Chen B., Wang J., Xu M. Ag85b/ESAT6-CFP10 adjuvanted with aluminum/poly-IC effectively protects guinea pigs from latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Vaccine*, 2019, 37, 4477–4484.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.078>
29. Franco A.R., Peri F. Developing new anti-tuberculosis vaccines: focus on adjuvants. *Cells*, 2021, 10, 78.
<https://doi.org/10.3390/cells10010078>
30. McShane H. Insights and challenges in tuberculosis vaccine development. *Lancet Respir. Med.*, 2019, 7, 810–819.
[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30274-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30274-7)
31. Moguche A.O., Musvosvi M., Penn-Nicholson A., Plumlee C.R., Mearns H., Geldenhuys H., Smit E., Abrahams D., Rozot V., Dintwe O., Hoff S.T., Kromann I., Ruhwald M., Bang P., Larson R.P., Shafiqi S., Ma S., Sherman D.R., Sette A., Lindestam Arlehamn C.S., McKinney D.M., Maecker H., Hanekom W.A., Hatherill M., Andersen P., Scriba T.J., Urdahl K.B. Antigen availability shapes T cell differentiation and function during tuberculosis. *Cell Host Microbe*, 2017, 21, 695–706.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.05.012>
32. Aagaard C.S., Hoang T.T., Vingsbo-Lundberg C., Dietrich J., Andersen P. Quality and vaccine efficacy of CD4⁺ T cell responses directed to dominant and subdominant epitopes in ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.*, 2009, 183(4), 2659–2668.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900947>
33. Jiang Q., Zhang J., Chen X., Xia M., Lu Y., Qiu W., Feng G., Zhao D., Li Y., He F., Peng G., Wang Y. A novel recombinant DNA vaccine encoding *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and FL protects against *Mycobacterium*

- tuberculosis* challenge in mice. *J. Biomed. Res.*, 2013, 27(5), 406–420.
<https://doi.org/10.7555/jbr.27.20120114>
34. Al Tbeishat H. Novel *in silico* mRNA vaccine design exploiting proteins of *M. tuberculosis* that modulates host immune responses by inducing epigenetic modifications. *Sci. Rep.*, 2022, 12, 4645.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-08506-4>
35. Andersen P., Scriba T.J. Moving tuberculosis vaccines from theory to practice. *Nat. Rev. Immunol.*, 2019, 19, 550–562.
<https://doi.org/10.1038/s41577-019-0174-z>
36. Barman S., Soni D., Brook B., Nanishi E., Dowling D.J. Precision vaccine development: cues from natural immunity. *Front. Immunol.*, 2022, 10(12), 662218.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.662218>
37. Woodworth J.S., Clemmensen H.S., Battey H., Dijkman K., Lindenstrøm T., Laureano R.S., Taplitz R., Morgan J., Aagaard C., Rosenkrands I., Lindestam Arlehamn C.S., Andersen P., Mortensen R. A *Mycobacterium tuberculosis* specific subunit vaccine that provides synergistic immunity upon co-administration with Bacillus Calmette-Guérin. *Nat. Commun.*, 2021, 12, 6658.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-26934-0>

Evaluation of the Immunogenicity of Recombinant Proteins CFP10-ESAT6 and CFP10-ESAT6-dIFN

E. A. Uvarova^{a, #}, S. M. Rozov^{a, #}, P. A. Belavin^a, and E. V. Deineko^a

^a*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian
Academy of Sciences, Novosibirsk, 630009 Russia*

[#]*e-mail: uvarova@bionet.nsc.ru*

Abstract—Early secreted proteins CFP10 and ESAT6 of *Mycobacterium tuberculosis*, characterized by high immunogenicity, are used as promising antigens in the development of subunit recombinant anti-tuberculosis vaccine candidates. To enhance the immunogenicity of such vaccines, it seems effective to add elements with adjuvant properties to the recombinant protein. Previously, in a guinea pig tuberculosis model, we showed that a significant protective effect was observed in animals immunized with the recombinant CFP10-ESAT6-dIFN protein. In this work, we have compared the response of IFN γ -producing CD8⁺ and CD4⁺ T cells and antibody response in mice to immunization with recombinant CFP10-ESAT6 or CFP10-ESAT6-dIFN. It was found that the addition of the dIFN domain to the CFP10-ESAT6 fusion protein led to a decrease in its immunogenicity.

Keywords: humoral response, recombinant protein, T cell response, tuberculosis, CD4⁺ lymphocytes, CD8⁺ lymphocytes, *Mycobacterium tuberculosis*, CFP10, ESAT6, dIFN