

УДК 615.371

# Иммуногенность различных форм гликопротеина S коронавируса ближневосточного респираторного синдрома

Т. А. Ожаровская<sup>1</sup>, О. В. Зубкова<sup>1</sup>, И. В. Должикова<sup>1</sup>, А. С. Громова<sup>1</sup>, Д. М. Гроусова<sup>1</sup>, А. И. Тухватулин<sup>1</sup>, О. Попова<sup>1</sup>, Д. В. Щебляков<sup>1</sup>, Д. Н. Щербинин<sup>1</sup>, А. Ш. Джаруллаева<sup>1</sup>, А. С. Ерохова<sup>1</sup>, М. М. Шмаров<sup>1</sup>, С. Я. Логинова<sup>2</sup>, С. В. Борисевич<sup>2</sup>, Б. С. Народицкий<sup>1</sup>, Д. Ю. Логунов<sup>1</sup>, А. Л. Гинцбург<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

<sup>2</sup>«48 центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, Сергиев Посад, ул. Октябрьская, 11

\*E-mail: logunov@gamaleya.org

Поступила в редакцию 30.11.2018

Принята к печати 30.01.2019

**РЕФЕРАТ** Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (БВРС-КоВ) был идентифицирован в 2012 году во время первых вспышек ближневосточного респираторного синдрома (БВРС). БВРС-КоВ вызывает острую инфекцию нижних дыхательных путей у человека, летальность при которой составляет ~35%. Зарегистрированные средства профилактической и терапевтической защиты против БВРС в настоящее время отсутствуют. Гликопротеин S БВРС-КоВ играет важнейшую роль в интернализации вируса. Белок S является иммунодоминантным антигеном и основной мишенью для нейтрализующих антител. Нами проведено сравнение иммуногенности пяти различных форм гликопротеина S БВРС-КоВ: полноразмерного гликопротеина S, полноразмерного гликопротеина S с трансмембранным доменом гликопротеина G вируса VSV (S-G), рецепторсвязывающего домена RBD гликопротеина S, мембраносвязанного RBD (слитого с трансмембранным доменом гликопротеина G вируса VSV, RBD-G) и RBD, слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека (RBD-Fc). Для доставки использовали рекомбинантные векторы на основе аденовируса человека серотипа 5 (rAd5). Вакцинация мышей всеми разработанными векторами rAd5 позволила сформировать сбалансированный Th1/Th2-ответ. Наиболее мощный антительный ответ развивался при иммунизации животных мембраносвязанным RBD (rAd5-RBD-G). Формирование нейтрализующих антител у всех вакцинированных животных наблюдалось только при иммунизации мембранными формами гликопротеина (rAd5-S, rAd5-S-G и rAd5-RBD-G). Наиболее выраженный клеточный ответ развивался при иммунизации животных полноразмерным S (rAd5-S). Проведенные исследования позволяют предположить, что среди всех изученных форм гликопротеина S наиболее перспективными для включения в вакцину против БВРС являются полноразмерный S и мембранная форма RBD (RBD-G).

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ближневосточный респираторный синдром, БВРС, БВРС-КоВ, гликопротеин, аденовирусный вектор, иммунитет.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** 95% ДИ – 95% доверительный интервал; APC – аллофикиоцианин; DPP4 – дипептидилпептидаза 4; Fc – кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина; rAd5 – рекомбинантный вектор на основе аденовируса человека серотипа 5; RBD – рецепторсвязывающий домен гликопротеина S БВРС-КоВ; RBD-Fc – рецепторсвязывающий домен гликопротеина S БВРС-КоВ, слитый с Fc IgG1 человека; RBD-G – рецепторсвязывающий домен гликопротеина S БВРС-КоВ, слитый с трансмембранным доменом гликопротеина G вируса везикулярного стоматита; S – гликопротеин БВРС-КоВ; S1, S2 – субъединицы гликопротеина S БВРС-КоВ; S-G – гликопротеин БВРС-КоВ с трансмембранным доменом гликопротеина G вируса везикулярного стоматита; Th – Т-хелперные клетки; VSV – вирус везикулярного стоматита; БВРС – ближневосточный респираторный синдром; БВРС-КоВ (MERS-CoV) – коронавирус ближневосточного респираторного синдрома;

**БОЕ** – бляшкообразующие единицы; **в.ч.** – вирусные частицы; **ГСТ** – геометрическое среднее титра антител; **ИФН-гамма** – интерферон-гамма; **ТМ** – трансмембранный домен/форма; **ТОРС** – тяжелый острый респираторный синдром; **ТОРС-КоВ** – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома; **ФСБ** – фосфатно-солевой буфер; **ФСБ-Т** – фосфатно-солевой буфер с 0.1% Твин 20; **ЭПР** – эндоплазматический ретикулум.

## ВВЕДЕНИЕ

Ближневосточный респираторный синдром (БВРС) – острое воспалительное заболевание органов дыхания, впервые был диагностирован в июне 2012 года в Саудовской Аравии. В 2013 году вирус, вызывающий БВРС, официально назвали коронавирусом ближневосточного респираторного синдрома – БВРС-КоВ [1, 2]. БВРС-КоВ представляет собой одноцепочечный РНК-вирус, принадлежащий к семейству Coronaviridae, род *Betacoronavirus*. БВРС-КоВ, природным резервуаром которого являются одногорбые верблюды, попадают в организм человека при употреблении непастеризованного молока верблюдов, возможна также передача вируса аэрозольным путем [3–5].

На сегодняшний день зарегистрировано 2260 лабораторно подтвержденных случаев инфекции БВРС-КоВ, из них 803 с летальным исходом [6, 7]. В связи с высокой смертностью (около 35%) [6], широким распространением резервуара инфекции, а также с отсутствием эффективных профилактических и терапевтических препаратов против БВРС, специалисты ВОЗ относят БВРС-КоВ к вирусам, потенциально способным вызывать пандемии [8], для предотвращения которых необходима разработка вакцинного препарата.

Гликопротеин S – основной протективный антиген БВРС-КоВ, формирует тримеры на поверхности оболочки вируса и играет важную роль в интернализации вируса в клетку [9]. Гликопротеин S состоит из двух субъединиц: S1, содержащей рецепторсвязывающий домен (RBD), и S2, опосредующей слияние мембран вируса и клетки [10–13]. Эти особенности делают белок S перспективной мишенью при разработке вакцин против БВРС [14–17]. Рецепторсвязывающий домен (RBD) гликопротеина S является ключевой мишенью при разработке профилактических и терапевтических препаратов против БВРС [18–20], так как он опосредует взаимодействие между вирусной частицей БВРС-КоВ и рецептором DPP4 на поверхности клетки.

Для разработки эффективной вакцины против БВРС важно понимать, какую форму гликопротеина необходимо использовать в составе вакцины, чтобы обеспечить защиту от БВРС. Опубликованы данные об иммуногенности различных форм гликопротеина БВРС-КоВ [21–25], но вопрос о том, что предпочтительнее выбрать для вакцины, остается открытым, поскольку панель антигенов не исследовали в одина-

ковых условиях. Чтобы устранить этот пробел, нами сконструированы пять рекомбинантных векторов на основе аденовируса человека серотипа 5 (rAd5), экспрессирующих различные варианты гликопротеина S БВРС-КоВ:

- полноразмерный гликопротеин S, который локализуется в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР);
- два секреторируемых варианта рецепторсвязывающего домена гликопротеина S, содержащих лидерный пептид щелочной фосфатазы (RBD и RBD, слитый с Fc IgG1 человека, для повышения стабильности и иммуногенности [18, 19]),
- две трансмембранные (ТМ) формы, локализованные в плазматической мембране клетки – полноразмерный S и RBD с ТМ-доменом гликопротеина G вируса везикулярного стоматита (VSV). Поскольку полноразмерный гликопротеин S локализуется в ЭПР [26], мы сконструировали вариант S-G с делетированным сигналом локализации в ЭПР.

Для доставки гликопротеина S выбрана платформа на основе рекомбинантных вирусных векторов rAd5, поскольку такие векторы способны осуществлять эффективную доставку трансгена во многие типы клеток [27, 28]; их геном полностью охарактеризован, они способны к росту до высоких титров [29], а также способны индуцировать мощный гуморальный и клеточный иммунный ответ [30, 31].

В настоящей работе представлены результаты сравнения гуморального и клеточного иммунного ответа, индуцированного вакцинацией мышей rAd5, несущих различные формы гликопротеина S БВРС-КоВ.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Клеточные линии

Клетки HEK293 и A549 получены из Российской коллекции клеточных линий позвоночных (Россия), клетки HEK293T и Vero E6 получены из ATCC (США). Все клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>.

### Получение рекомбинантных аденовирусных частиц, экспрессирующих различные варианты гликопротеина S вируса БВРС-КоВ

Аминокислотные последовательности гликопротеина S БВРС-КоВ изолятов 2015–2017 годов получены из базы данных NCBI [32]. С использованием про-

граммы Geneious® 10.2.3 на основе аминокислотных последовательностей построена консенсусная последовательность гликопротеина S. Нуклеотидные последовательности, кодирующие различные формы гликопротеинов, были оптимизированы для экспрессии в клеточных линиях млекопитающих и синтезированы компанией «Евроген» (Россия). Получены пять рекомбинантных плазмид pAd5-S, pAd5-S-G, pAd5-RBD, pAd5-RBD-G и pAd5-RBD-Fc. rAd5 получали по методике, описанной ранее [33].

#### **Получение лентивирусных частиц, псевдотипированных гликопротеином S БВРС-КоВ (псевдовирусов)**

Для получения псевдовирусов клетки HEK293T высевали в 15-см культуральные чашки и котрансфицировали тремя плазмидами (pCMVΔR8,2; pLV-CMV-EGFP; pCMV-MERS-CoV-S). Спустя 72 ч супернатанты собирали, фильтровали, разливали в пробирки и замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Для титрования псевдовируса использовали клетки Vero E6. Титр псевдовируса выражали в единицах формирования фокусов флуоресценции (FFU, fluorescent forming units).

#### **Определение экспрессии различных форм гликопротеина S вируса БВРС-КоВ методом вестерн-блоттинга**

Клетки HEK293 высевали в 35-мм чашки Петри и инкубировали в течение ночи до 70% монослоя, после чего клетки обрабатывали rAd5 в количестве 100 БОЕ/клетку. rAd5-null использовали как контрольный вирус. Экспрессию различных форм гликопротеина вируса БВРС-КоВ определяли через 24 ч методом вестерн-блоттинга с использованием антител, специфичных к гликопротеину S (40069-RP02, Sino Biological, Китай), и антител, специфичных к IgG кролика (NA934V, GE, Великобритания). Экспрессию мембраносвязанных вариантов гликопротеина (S, S-G, RBD-G) детектировали в лизатах клеток, приготовленных с помощью буфера Cell Culture Lysis Reagent (Promega, США). Экспрессию секретируемых вариантов гликопротеина (RBD, RBD-Fc) детектировали в среде от клеток. На лунку наносили по 10 мкл образцов лизатов (10 мкг общего белка), образцы среды наносили в количестве 10 мкл на лунку.

#### **Лабораторные животные**

Все эксперименты на животных проводили в строгом соответствии с рекомендациями Национального стандарта Российской Федерации (ГОСТ 33044-2014, «Принципы надлежащей лабораторной практики»). Шестинедельные самки мышей C57/BL6 (18–20 г) были получены из питомника Пушино (Россия).

Мыши имели свободный доступ к воде и пище, размещались в системе содержания животных ISOcage (Tecniplast, Италия).

#### **Иммунизация и сбор образцов сывороток**

Мышей случайным образом распределяли по группам ( $n = 5$  при анализе гуморального ответа,  $n = 9$  при анализе клеточного ответа) и вакцинировали рекомбинантными аденовирусными частицами внутримышечно в дозе  $10^8$  в.ч./мышь в общем объеме 0.1 мл. Сыворотки собирали через 21 день после вакцинации для исследования титров S-специфических IgG.

#### **Определение титра антител в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА)**

Титр гликопротеин-специфических антител в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа. Использовали рекомбинантные белки: гликопротеин S (40069-V08B; Sino Biological) и RBD (40071-V08B1; Sino Biological). Блокирование мест неспецифического связывания проводили раствором ФСБ в 0.1% Твин 20 (ФСБ-Т), содержащем 5% обезжиренного молока (A0830; AppliChem, Испания). Сыворотки титровали двукратным шагом в растворе ФСБ-Т с 3% обезжиренным молоком. Для детекции использовали вторичные антитела, специфичные к IgG мыши и конъюгированные с пероксидазой хрена (для определения общего титра IgG – NXA931 (GE Healthcare, США); для IgG1 – ab97240 (Abcam, Великобритания); для IgG2a – ab97245 (Abcam); для IgG2b – ab97250 (Abcam); для IgG3 – ab97260 (Abcam)). Проявляли с использованием раствора тетраметилбензидина (НИИОПик, Россия). Реакцию останавливали добавлением 1 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм ( $\text{OD}_{450}$ ) на планшетном спектрофотометре Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific). Титр IgG определяли как максимальное разведение сыворотки, в котором значение  $\text{OD}_{450}$  сыворотки иммунизированного животного превосходит значение контрольной сыворотки более чем в 2 раза.

#### **Реакция нейтрализации псевдовирионов (PsVNA)**

Реакцию нейтрализации псевдовирионов (PsVNA) проводили по методике, описанной ранее [34]. Готовили разведения сывороток, инактивированных нагреванием: 1 : 10, 1 : 40, 1 : 160 и 1 : 640. Затем эти образцы смешивали с равным объемом среды DMEM, содержащим  $10^5$  FFU/мл псевдовирионов. Эту смесь инкубировали в течение 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ , инокулировали на монослой клеток Vero E6 и инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 42 ч. Затем подсчитывали количество фокусов флуоресцентных клеток EGFP. Титр нейтрализации псевдовирионов в сыворотке иммунизированного животного определяли как максимальное

разведение, при котором наблюдали 50% снижение количества фокусов флуоресцентных клеток EGFP по сравнению с сыворотками интактных (не вакцинированных) животных.

### Анализ Т-клеточного ответа (лимфопротеративный анализ)

Животных забивали на 8 день после иммунизации и отбирали селезенки, которые гомогенизировали через сито с диаметром пор 100 мкм в стерильном ФСБ. Спленоциты выделяли с помощью центрифугирования (800 g, 30 мин) на подушке раствора фиколла (1.09 г/мл, «ПанЭко», Россия). Для анализа пролиферации Т-клеток спленоциты окрашивали карбоксифлуоресцеином с использованием набора Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) tracer kit (Invitrogen, США) по описанной ранее методике [35]. Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты в количестве 200000 клеток на лунку в среде RPMI1640, рестимулировали рекомбинантным S БВРС-КоВ (40071-V08B1; Sino Biological) в количестве 1 мкг/лунку. Через 3 дня клетки собирали, промывали ФСБ и окрашивали антителами, специфичными к CD3, CD4 и CD8: аллофикоцианин (APC)-меченные антитела к CD3, APC-Су7-меченные антитела к CD8 и фикоэритрин-меченные антитела к CD4 (BD Biosciences, США), и фиксировали в растворе 1% параформальдегида. Пролиферирующие CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты определяли в клеточной смеси с использованием проточного цитофлуориметра BD FACS Aria III (BD Biosciences). Результирующий процент пролиферирующих клеток (X) рассчитывали по формуле  $X = \%st - \%$ , где  $\%st$  – процент пролиферирующих клеток после рестимуляции спленоцитов рекомбинантным гликопротеином S вируса БВРС-КоВ, а  $\%$  – процент пролиферирующих клеток без рестимуляции (интактных клеток).

### Анализ продукции интерферона гамма (ИФН-гамма)

Спленоциты выделяли на 15 день после вакцинации по методике, описанной выше. Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты в количестве 200000 клеток на лунку в среде RPMI1640, далее их рестимулировали рекомбинантным S БВРС-КоВ (40071-V08B1; Sino Biological) в количестве 1 мкг/лунку. Через 48 ч собирали надосадочную среду. Концентрацию ИФН-гамма в среде измеряли методом ИФА с помощью коммерческого набора (mouse IFN- $\gamma$  ELISA kit; Invitrogen) по протоколу фирмы-производителя. Прирост концентрации ИФН-гамма определяли по формуле  $X = Cst / Cint$ , где X – прирост концентрации ИФН-гамма (разы), Cst – концентрация ИФН-гамма в среде от стимулированных клеток (пг/мл), Cint – концентрация ИФН-гамма в среде от нестимулированных (интактных) клеток (пг/мл).

### Статистический анализ

Статистический анализ выполнен с использованием программного обеспечения GraphPad 7.0 (GraphPad Software, США). При анализе данных несвязанных выборок использовали критерий Стьюдента для независимых образцов или критерий Манна–Уитни в зависимости от нормальности распределения данных. Нормальность распределения определяли с помощью обобщенного теста Д’Агостино–Пирсона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Получение rAd5

Для определения и сравнения иммуногенности различных форм гликопротеина S вируса БВРС-КоВ нами получено пять rAd5: rAd5-S, rAd5-S-G, rAd5-RBD, rAd5-RBD-G и rAd5-RBD-Fc. Схемы целевых трансгенов в геномах rAd5 показаны на рис. 1А.

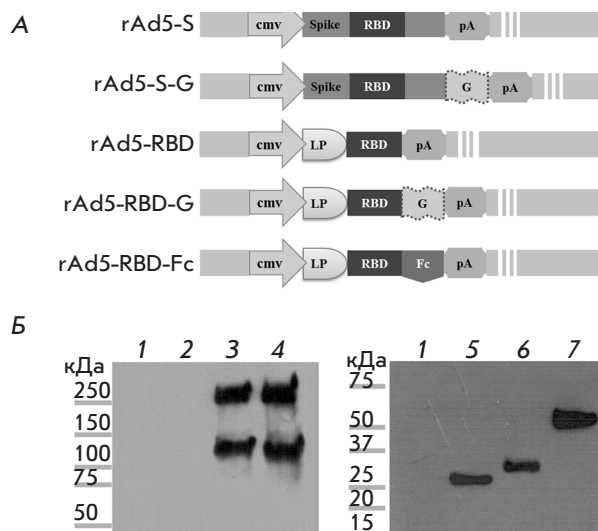


Рис. 1. А – схемы целевых трансгенов в геномах rAd5-S, rAd5-S-G, rAd5-RBD, rAd5-RBD-G и rAd5-RBD-Fc. cmv – промотор E1-области цитомегаловируса человека; G – ген гликопротеина G вируса везикулярного стоматита; LP – лидерная последовательность, опосредующая секрецию белка; pA – сигнал полиаденилирования; RBD – рецепторсвязывающий домен гликопротеина S БВРС-КоВ; Spike – гликопротеин S БВРС-КоВ. Б – Вестерн-блот-анализ вариантов гликопротеина S БВРС-КоВ, экспрессируемых каждым rAd5. Линия 1 – лизат клеток, обработанных контрольным rAd5-null; линия 2 – интактные клетки; линия 3 – лизат клеток, обработанных rAd5-S; линия 4 – лизат клеток, обработанных rAd5-S-G; линия 5 – среда от клеток, обработанных rAd5-RBD; линия 6 – лизат клеток, обработанных rAd5-RBD-G; линия 7 – среда от клеток, обработанных rAd5-RBD-Fc

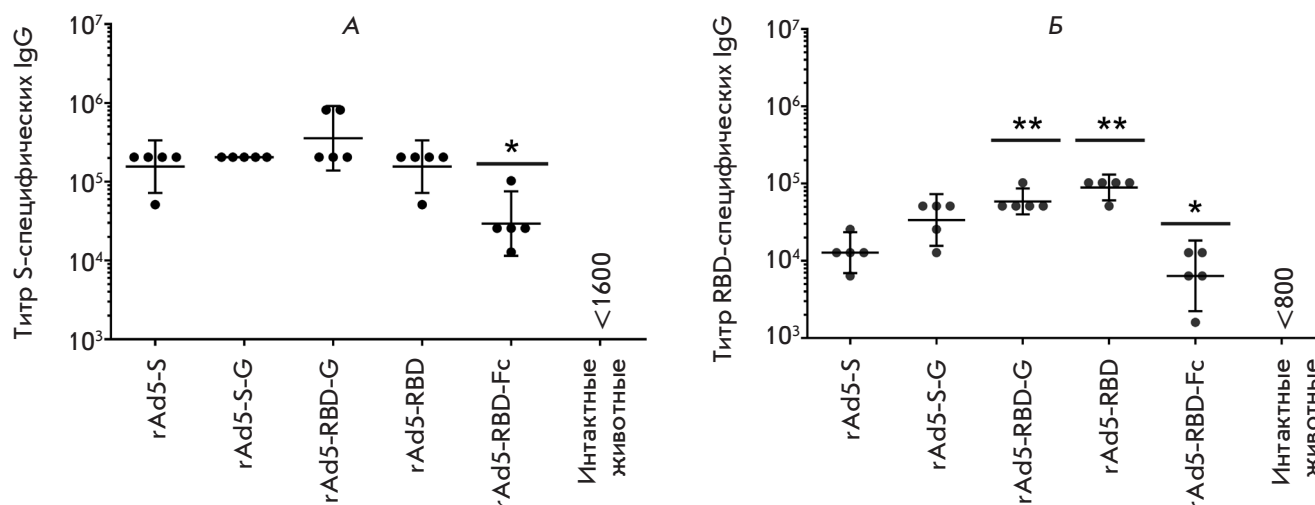


Рис. 2. Титры гликопротеин-специфических IgG в сыворотках крови иммунизированных животных. Представлены титры IgG, специфичных к гликопротеину S БВРС-КоВ (А) и к RBD (Б). Отмечено геометрическое среднее титра (ГСТ) и 95% доверительный интервал ГСТ для каждой группы ( $n = 5$ ). Звездочки указывают на статистически значимые различия в титрах IgG между группами. \*  $p < 0.05$ , сравнение rAd5-RBD-Fc с другими группами; \*\*  $p < 0.05$ , сравнение rAd5-RBD и rAd5-RBD-G с другими группами, за исключением rAd5-RBD и rAd5-RBD-G (тест Манна-Уитни)

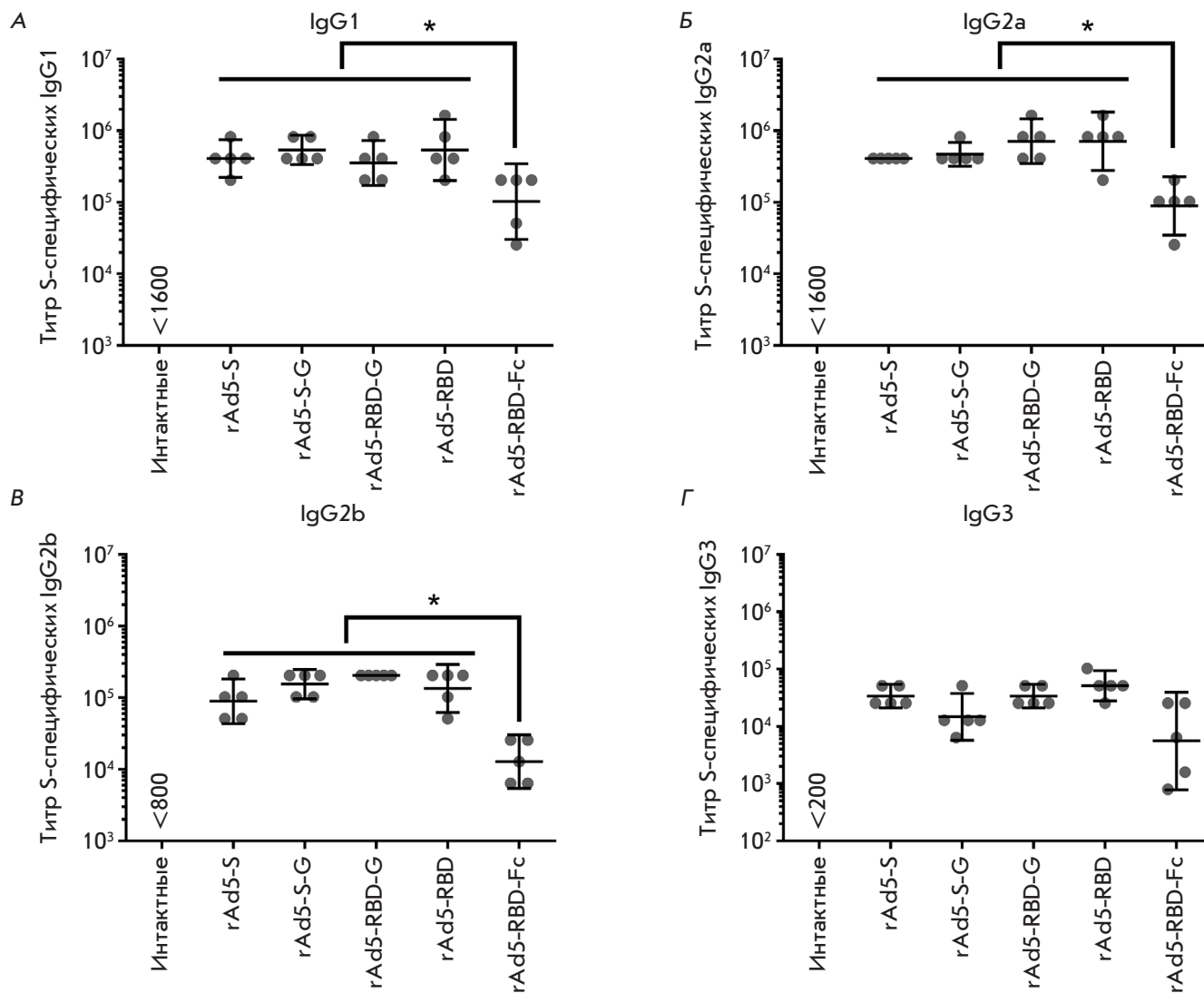
Экспрессию различных форм гликопротеина S БВРС-КоВ анализировали методом вестерн-блоттинга (рис. 1Б). В образцах полноразмерного гликопротеина (rAd5-S и rAd5-S-G) белок S выявляли в виде двух полипептидов (рис. 1Б), причем верхняя полоса представляла собой гликозилированную форму белка S (~230–250 кДа), а нижняя (~100 кДа) – субъединицу S1, которая образуется в результате расщепления полноразмерного S протеазами клетки. Молекулярные массы полос превышали рассчитанные по нуклеотидной последовательности, что свидетельствует о предполагаемом гликозилировании белка [14, 16, 36–38]. В образцах RBD (RBD, RBD-G и RBD-Fc) выявлен единственный полипептид (рис. 1Б) с массой ~25, ~30 и ~55 кДа соответственно. Масса полипептидов на основе RBD соответствовала расчетным.

**rAd5, экспрессирующие различные формы гликопротеина S вируса БВРС-КоВ, индуцируют формирование гуморального иммунного ответа**

Мышей иммунизировали препаратами rAd5-S, rAd5-S-G, rAd5-RBD, rAd5-RBD-G и rAd5-RBD-Fc внутримышечно однократно в дозе 10<sup>8</sup> в.ч. Через 3 недели после иммунизации собирали сыворотки крови мышей и анализировали титры антител, специфичных к гликопротеину S и к RBD (рис. 2). В сыворотке крови мышей контрольных групп (неиммунизированные и иммунизированные rAd5-null) гликопротеин-специфические IgG не обнаружены. Наибольший титр IgG, специфичных к гликопро-

теину S, наблюдали в группе животных, иммунизированных rAd5-RBD-G [геометрическое среднее титра (ГСТ): 356055; 95% доверительный интервал (ДИ): 139042–911772], наименьший – у животных, иммунизированных rAd5-RBD-Fc (ГСТ: 29407, 95% ДИ: 11455–75492) (рис. 2А). Анализ IgG, специфичных к RBD, показал, что наиболее иммуногенными были конструкции rAd5-RBD-G (ГСТ: 89144, 95% ДИ: 60665–130994) и rAd5-RBD (ГСТ: 58831, 95% ДИ: 40024–86424), а наименее иммуногенной – rAd5-RBD-Fc (ГСТ: 6400, 95% ДИ: 2230–18364). Статистически значимых различий в титрах IgG, специфичных к RBD, между группами rAd5-RBD и rAd5-RBD-G не обнаружено (рис. 2Б).

У мышей известно четыре изотипа IgG, которые отвечают за идентификацию и клиренс многих антигенов: IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 [39]. Определение титров изотипов IgG через 3 недели после иммунизации показало, что у всех иммунизированных животных представлены все четыре изотипа IgG (рис. 3). Значения титров IgG1, IgG2a и IgG2b для каждой группы иммунизированных животных составляли: rAd5-S (ГСТ: 409600, 409600 и 89144 соответственно), rAd5-S-G (ГСТ: 540470, 470506 и 155209 соответственно), rAd5-RBD (ГСТ: 540470, 713155 и 135118 соответственно) и rAd5-RBD-G (ГСТ: 356578, 713155 и 204800 соответственно). При этом не обнаружено статистически значимых различий в титрах изотипов IgG. После вакцинации rAd5-RBD-Fc значения титров IgG1, IgG2a и IgG2b были существенно ниже, чем в других группах (ГСТ: 102400, 89144 и 12800 со-



**Рис. 3.** Анализ изотипов IgG-антител у мышей после иммунизации rAd5, экспрессирующими различные формы гликопротеина S БВРС-КоВ. Представлены титры IgG1 (А), IgG2a (Б), IgG2b (В) и IgG3 (Г), специфичных к гликопротеину S БВРС-КоВ, в сыворотке иммунизированных животных. Отмечено геометрическое среднее титра (ГСТ) и 95% доверительный интервал ГСТ для каждой группы ( $n = 5$ ). Звездочки указывают на статистически значимые различия в титрах IgG между группами. \*  $p < 0.05$ , тест Манна-Уитни

ответственно). Титр IgG3 не различался существенно в группах (rAd5-S, rAd5-S-G, rAd5-RBD, rAd5-RBD-G и rAd5-RBD-Fc; ГСТ: 33779, 14703, 51200, 33779 и 5572 соответственно). Таким образом, согласно полученным данным, наибольший вклад в общий титр гликопротеин-специфических IgG вносят изотипы IgG1 и IgG2a.

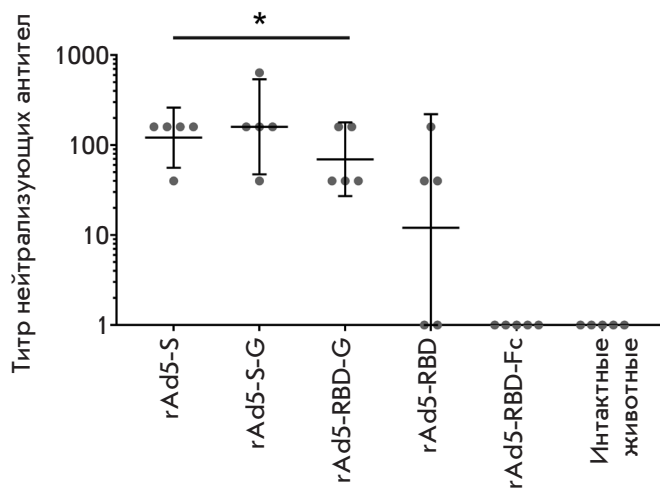
**rAd5, экспрессирующие мембранные формы гликопротеина БВРС-КоВ, вызывают выработку нейтрализующих антител у мышей**

Определение титра нейтрализующих антител (в реакции нейтрализации псевдовироионов) показало,

что сыворотки крови всех мышей, иммунизированных rAd5-S, rAd5-S-G и rAd5-RBD-G, содержат нейтрализующие антитела (рис. 4) с ГСТ 1 : 121, 1 : 160 и 1 : 70 соответственно, без статистически значимой разницы в титрах ( $p > 0.05$ ). В группе rAd5-RBD только у трех мышей из пяти обнаружены нейтрализующие антитела, тогда как в группах rAd5-RBD-Fc и у интактных животных нейтрализующие антитела не обнаружены. Таким образом, результаты проведенного эксперимента показали, что только иммунизация rAd5, экспрессирующими мембранные формы гликопротеина (S, S-G, RBD-G), позволяет индуцировать выработку нейтрализующих антител.

**rAd5, экспрессирующие варианты S-белка БВРС-КоВ, индуцируют формирование клеточного иммунного ответа**

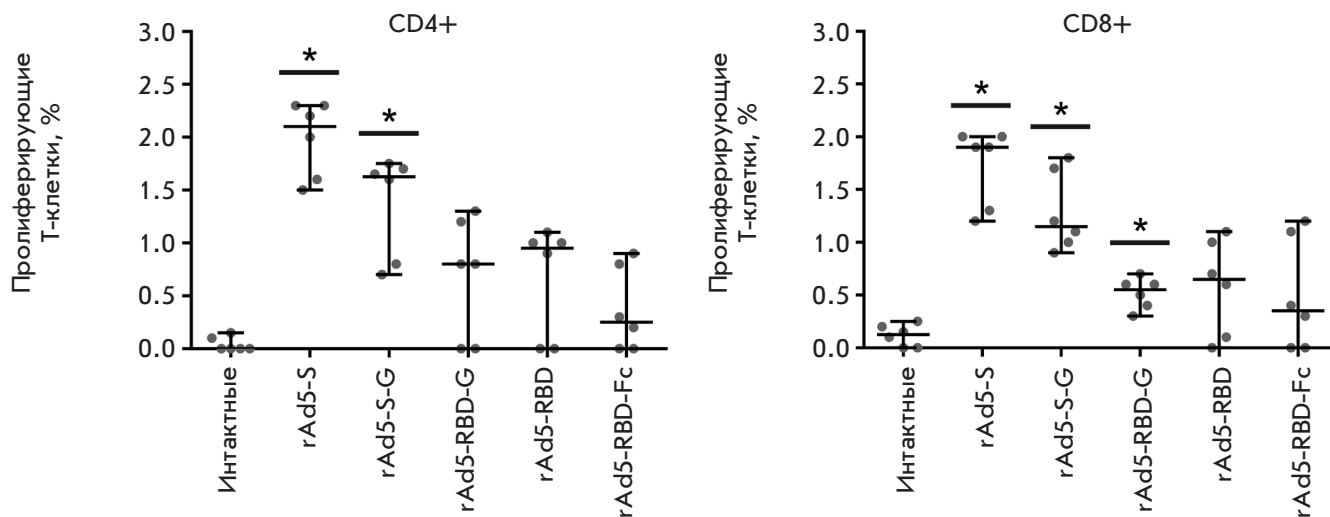
Поствакцинальный клеточный иммунный ответ оценивали двумя методами – по количеству пролифе-



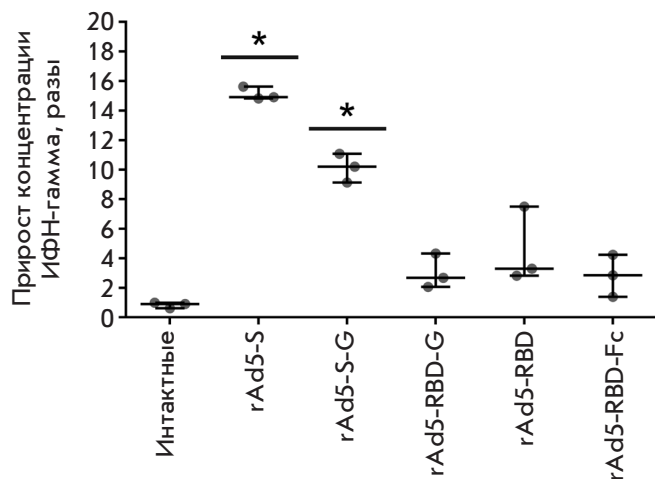
**Рис. 4.** Титры нейтрализующих антител в сыворотках крови иммунизированных животных. Реакцию нейтрализации проводили с использованием лентивирусных частиц, псевдотипированных гликопротеином S БВРС-КоВ. Отмечено геометрическое среднее титра (ГСТ) и 95% доверительный интервал ГСТ для каждой группы ( $n = 5$ ). Звездочки указывают на отсутствие значимых различий в титрах нейтрализующих антител между группами. \*  $p > 0.05$ , тест Манна–Уитни

рирующих Т-клеток и по продукции ИФН-гамма Т-клетками в ответ на рестимуляцию гликопротеином. Повторную стимуляцию проводили с использованием полноразмерного S, так как он содержит наибольшее количество эпитопов и присутствует в вирусных частицах БВРС-КоВ.

Анализ пролиферации CD4<sup>+</sup> клеток на 8-й день после вакцинации (рис. 5, слева) выявил наибольшую лимфопролиферативную активность в группе rAd5-S (2.10%) и наименьшую – в группе rAd5-RBD-Fc (0.25%). Статистически значимые различия в лимфопролиферативном ответе CD4<sup>+</sup> клеток между группами иммунизированных и интактных животных наблюдали в группах rAd5-S (2.10%) и rAd5-S-G (1.63%). Анализ пролиферации CD8<sup>+</sup> клеток (рис. 5, справа) выявил наибольшую лимфопролиферативную активность в группе rAd5-S (1.90%), наименьшую – в группе rAd5-RBD-Fc (0.35%). Статистически значимые различия в лимфопролиферативном ответе CD8<sup>+</sup> клеток между группами иммунизированных и интактных животных наблюдали в группах rAd5-S (1.90%), rAd5-S-G (1.15%) и rAd5-RBD-G (0.55%). Исследование продукции ИФН-гамма спленоцитами после рестимуляции гликопротеином S БВРС-КоВ также показало, что наиболее выраженный клеточный иммунный ответ развивался у животных, иммунизированных rAd5-S и rAd5-S-G (рис. 6): прирост концентрации ИФН-гамма составил  $15.12 \pm 0.43$  и  $10.14 \pm 0.97$  раза относительно интактных клеток соответственно.



**Рис. 5.** Исследование лимфопролиферативной активности спленоцитов у иммунизированных мышей. По осям ординат отмечены уровни (%) пролиферирующих CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, рестимулированных белком S БВРС-КоВ на 8-й день после вакцинации. Отмечены медианы пролиферирующих клеток (%) после рестимуляции и 95% ДИ медианы для каждой группы ( $n = 6$ ). Звездочки указывают на статистически значимые различия в % пролиферирующих клеток между вакцинированными и интактными животными. \*  $p < 0.05$ , тест Манна–Уитни



**Рис. 6.** Прирост концентрации ИФН-гамма в среде спленцитов иммунизированных мышей после рестимуляции рекомбинантным полноразмерным белком S вируса БВРС-КоВ. Отмечены медианы прироста концентрации ИФН-гамма после рестимуляции и 95% ДИ медианы для каждой группы ( $n = 3$ ). Звездочки указывают на статистически значимые различия в приросте концентрации ИФН-гамма между клетками от вакцинированных и интактных животных. \*  $p < 0.05$ , тест Стьюдента для независимых выборок

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время не существует специфических профилактических и терапевтических средств против ближневосточного респираторного синдрома. Интенсивные исследования, направленные на разработку вакцин против этого заболевания, ведутся в США, Германии, Корее и других странах [40, 41]. Известно несколько кандидатных вакцин на основе гликопротеина БВРС-КоВ: вирусные векторы на основе рекомбинантных вирусов осповакцины, аденовируса, вируса кори и др., ДНК-вакцины, комбинированные кандидатные вакцины на основе ДНК и рекомбинантного белка, кандидатные вакцины на основе вирусоподобных частиц и рекомбинантных белков [22, 38, 41–46].

Ключевым моментом в разработке вакцины является выбор антигена. Большинство вакцин против БВРС основаны на использовании различных форм гликопротеина БВРС-КоВ (полноразмерный S, субъединица S1, RBD) [14–16, 18, 22, 24, 47–55] – основной мишени нейтрализующих антител. Однако вопрос о том, какую форму выбрать для получения эффективной вакцины, остается открытым. Известно, что использование полноразмерного S обеспечивает защиту 100% животных от летальной инфекции, вызванной БВРС-КоВ [44]. Однако некоторые авторы высказывают опасения по по-

ду использования полноразмерного S БВРС-КоВ в составе вакцины. Так сообщалось, что вакцина на основе полноразмерного гликопротеина коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС), который, как и БВРС-КоВ, относится к роду *Betacoronavirus*, приводит к развитию иммунопатологии в легких, обусловленной мощным антительным ответом на гликопротеин ТОРС-КоВ и слабым клеточным (Th2-поляризованный иммунный ответ) [56, 57].

Модификации гликопротеина в основном были направлены на то, чтобы в антиген входил рецепторсвязывающий домен гликопротеина. Показана иммуногенность S1-субъединицы, RBD или RBD, слитого с Fc-фрагментом IgG человека [15, 18, 19, 49, 58]. Исследования протективности препаратов на основе RBD (субъединичные вакцины) показали, что вакцинация RBD защищала ~80% животных от БВРС-КоВ, несмотря на высокие титры нейтрализующих антител, способных блокировать взаимодействия между вирусом и рецептором DPP4 на поверхности клетки [42, 59]. Отсутствие 100% защиты связано, по всей видимости, с необходимостью развития клеточного иммунного ответа, а также блокирования слияния мембран вируса и клетки, опосредованного S2-субъединицей. Кроме того, использование субъединичных, а также инактивированных вакцин не позволяет сформировать сбалансированный Th1/Th2-ответ и часто приводит к формированию Th2-поляризованного иммунного ответа [22, 42], развитие которого в случае БВРС может привести к иммунопатологии легких [48]. Поэтому при разработке вакцины против БВРС важно учитывать, что иммунитет, индуцированный вакциной, должен быть Th1/Th2-сбалансированным.

Исследовано множество антигенов на основе гликопротеина S БВРС-КоВ; однако не проводилось прямого сравнения этих антигенов в одинаковых условиях (с использованием одинаковых платформ для доставки антигенов). В настоящей работе проведено прямое сравнение иммуногенности пяти различных форм гликопротеина S БВРС-КоВ в одинаковых условиях, для доставки использовали rAd5. У животных, вакцинированных rAd5, экспрессирующими различные формы гликопротеина S БВРС-КоВ, развивался мощный антительный (преимущественно IgG1 и IgG2a) и Т-клеточный ответ, причем каждый из вариантов rAd5 позволял сформировать сбалансированный Th1/Th2-ответ, что является одним из ключевых моментов в разработке вакцины против БВРС. Исследование напряженности гуморального иммунного ответа показало, что мембранная форма RBD (rAd5-RBD-G) вызывает более мощный IgG-ответ, чем другие исследуемые формы. Показано



также, что только мембранные формы гликопротеина БВРС-КоВ (rAd5-S, rAd5-S-G и rAd5-RBD-G) стимулировали выработку нейтрализующих антител. Исследование напряженности клеточного иммунного ответа показало, что наибольшей иммуногенностью обладают формы полноразмерного гликопротеина БВРС-КоВ (rAd5-S и rAd5-S-G).

Таким образом, результаты нашей работы позволяют предположить, что из всех изученных форм гликопротеина S БВРС-КоВ наибольший интерес для включения в вакцину представляют полноразмерный гликопротеин S и мембранная форма RBD (RBD-G).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе изучена иммуногенность пяти вариантов гликопротеина S вируса БВРС-КоВ у мышей. Для доставки антигенов использовали платформу на основе рекомбинантных аденовирусных векторов rAd5. Нами показано, что:

- наиболее мощный антителый ответ развивался при иммунизации животных мембраносвязанным RBD (rAd5-RBD-G);
- только мембранные формы гликопротеина БВРС-КоВ (rAd5-S, rAd5-S-G и rAd5-RBD-G) индуцировали выработку нейтрализующих антител у всех вакцинированных мышей;
- наиболее выраженный клеточный иммунный ответ развивался при иммунизации животных полноразмерным гликопротеином (rAd5-S);
- вакцинация мышей всеми разработанными векторами rAd5 позволила сформировать сбалансированный Th1/Th2-ответ. ●

*Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (номер государственного задания 056-00108-18-00).*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанного с публикацией этой статьи.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drosten C., Enjuanes L., Fouchier R.A.M., Galiano M., Gorbalenya A.E., Memish Z.A., et al. // J. Virol. 2013. V. 87. № 14. P. 7790–7792.
2. Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. // N. Engl. J. Med. 2012. V. 367. № 19. P. 1814–1820.
3. Memish Z.A., Cotten M., Meyer B., Watson S.J., Alshafiq A.J., Al Rabeeah A.A., Corman V.M., Sieberg A., Makhdoom H.Q., Assiri A., et al. // Emerg. Infect. Dis. 2014. V. 20. № 6. P. 1012–1015.
4. Reusken C.B., Farag E.A., Jonges M., Godeke G.J., El-Sayed A.M., Pas S.D., Raj V.S., Mohran K.A., Moussa H.A., Ghobashy H., et al. // Euro. Surveill. 2014. V. 19. № 23. P. 1–5.
5. Azhar E.I., Hashem A.M., El-Kafrawy S.A., Sohra S.S., Aburizaiza A.S., Farraja S.A., Hassan A.M., Al-Saeeda M.S., Jamjoom G.A., Madani T.A. // MBio. 2014. V. 5. № 4. P. 1–4.
6. World Health Organisation | Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). <http://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>.
7. Aly M., Elrobh M., Alzayer M., Aljuhani S., Balkhy H. // PLoS One. 2017. V. 12. № 10. P. 1–11.
8. World Health Organisation | WHO Research and Development Blueprint: 2017 Annual review of diseases prioritized under the Research and Development Blueprint. <http://www.who.int/blueprint/what/research-development/2017-Prioritization-Long-Report.pdf>.
9. Qian Z., Dominguez S.R., Holmes K.V. // PLoS. One. 2013. V. 8. № 10. P. e76469.
10. Millet J.K., Whittaker G.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 42. P. 15214–15219.
11. Lu G., Wang Q., Gao G.F. // Trends Microbiol. 2015. V. 23. № 8. P. 468–478.
12. Lu L., Liu Q., Zhu Y., Chan K.-H., Qin L., Li Y., Wang Q., Chan J.F.-W., Du L., Yu F., et al. // Nat. Commun. 2014. V. 5. № 3067. P. 1–12.
13. Raj V.S., Mou H., Smits S.L., Dekkers D.H., Müller M.A., Dijkman R., Muth D., Demmers J.A., Zaki A., Fouchier R.A., et al. // Nature. 2013. V. 495. № 7440. P. 251–254.
14. Song F., Fux R., Provacia L.B., Volz A., Eickmann M., Becker S., Osterhaus A.D., Haagmans B.L., Sutter G. // J. Virol. 2013. V. 87. № 21. P. 11950–11954.
15. Kim E., Okada K., Kenniston T., Raj V.S., AlHajri M.M., Farag E.A.B.A., AlHajri F., Osterhaus A.D.M.E., Haagmans B.L., Gambotto A. // Vaccine. 2014. V. 32. № 45. P. 5975–5982.
16. Guo X., Deng Y., Chen H., Lan J., Wang W., Zou X., Hung T., Lu Z., Tan W. // Immunology. 2015. V. 145. № 4. P. 476–484.
17. Liu R., Wang J., Shao Y., Wang X., Zhang H., Shuai L., Ge J., Wen Z., Bu Z. // Antiviral Res. 2018. V. 150. P. 30–38.
18. Du L., Kou Z., Ma C., Tao X., Wang L., Zhao G., Chen Y., Yu F., Tseng C.T.K., Zhou Y., Jiang S. // PLoS One. 2013. V. 8. № 12. P. 2–10.
19. Du L., Zhao G., Kou Z., Ma C., Sun S., Poon V.K.M., Lu L., Wang L., Debnath A.K., Zheng B.-J., et al. // J. Virol. 2013. V. 87. № 17. P. 9939–9942.
20. Ma C., Li Y., Wang L., Zhao G., Tao X., Tseng C.T.K., Zhou Y., Du L., Jiang S. // Vaccine. 2014. V. 32. № 18. P. 2100–2108.
21. Al-Amri S.S., Abbas A.T., Siddiq L.A., Alghamdi A., Sanki M.A., Al-Muhanna M.K., Alhabbab R.Y., Azhar E.I., Li X., Hashem A.M. // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 44875. P. 1–8.
22. Ma C., Wang L., Tao X., Zhang N., Yang Y., Tseng C.T.K., Li F., Zhou Y., Jiang S., Du L. // Vaccine. 2014. V. 32. № 46. P. 6170–6176.
23. Pallesen J., Wang N., Corbett K.S., Wrapp D., Kirchdoerfer R.N., Turner H.L., Cottrell C.A., Becker M.M., Wang L., Shi W., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. № 35. P. E7348–E7353.
24. Wang L., Shi W., Joyce M.G., Modjarrad K., Zhang Y., Leung K., Lees C.R., Zhou T., Yassine H.M., Kanekiyo M., et al. // Nat. Commun. 2015. V. 6. P. 7712.
25. Zhang N., Channappanavar R., Ma C., Wang L., Tang J., Garron T., Tao X., Tasneem S., Lu L., Tseng C.T., Zhou Y., Perlman S., Jiang S., Du L. // Cell. Mol. Immunol. 2016. V. 13. № 2. P. 180–190.
26. Du L., Yang Y., Zhou Y., Lu L., Li F., Jiang S. // Expert Opin. Ther. Targets. 2017. V. 21. № 2. P. 131–143.
27. Appaiahgari M.B., Vrati S. // Expert Opin. Biol. Ther. 2015. V. 15. № 3. P. 337–351.

28. Benihoud K., Yeh P., Perricaudet M. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999. V. 10. № 5. P. 440–447.
29. Kamen A., Henry O. // *J. Gene Med.* V. 6. P. 184–192.
30. Muruve D.A. // *Hum. Gene Ther.* 2004. V. 15. № 12. P. 1157–1166.
31. Dolzhikova I.V., Tokarskaya E.A., Dzharullaeva A.S., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Voronina O.L., Syromyatnikova S.I., Borisevich S.V., Pantyukhov V.B., Babira V.F., et al. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. № 3. P. 4–11.
32. Hatcher E.L., Zhdanov S.A., Bao Y., Blinkova O., Nawrocki E.P., Ostapchuck Y., Schäffer A.A., Brister J.R. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № D1. P. D482–D490.
33. Gribova I.Y., Tillib S.V., Tutykhina I.L., Shmarov C.E., Logunov D.Y., Verkhovskaya L.V., Naroditskii B.S., Gintsburg A.L. // *Acta Naturae.* 2011. V. 3. № 3. P. 64–70.
34. Grehan K., Ferrara F., Temperton N. // *Methods X.* 2015. V. 2. P. 379–384.
35. Quah B.J., Warren H.S., Parish C.R. // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. № 9. P. 2049–2056.
36. Chi H., Zheng X., Wang X., Wang C., Wang H., Gai W., Perlman S., Yang S., Zhao J., Xia X. // *Vaccine.* 2017. V. 35. № 16. P. 2069–2075.
37. Deng Y., Lan J., Bao L., Huang B., Ye F., Chen Y., Yao Y., Wang W., Qin C., Tan W. // *Emerg. Microbes Infect.* 2018. V. 7. № 60. P. 1–10.
38. Nyon M.P., Du L., Tseng C.K., Seid C.A., Pollet J., Naceanceno K.S., Agrawal A., Algaissi A., Peng B.H., Tai W., et al. // *Vaccine.* 2018. V. 36. № 14. P. 1853–1862.
39. Snapper C.M., Mond J.J. // *Immunol. Today.* 1993. V. 14. № 1. P. 15–17.
40. Perlman S., Vijay R. // *Int. J. Infect. Dis.* 2016. V. 47. P. 23–28.
41. Okba N.M., Raj V.S., Haagmans B.L. // *Curr. Opin. Virol.* 2017. V. 23. P. 49–58.
42. Tai W., Zhao G., Sun S., Guo Y., Wang Y., Tao X., Tseng C.K., Li F., Jiang S., Du L., Zhou Y. // *Virology.* 2016. V. 499. P. 375–382.
43. Alharbi N.K., Padron-Regalado E., Thompson C.P., Kupke A., Wells D., Sloan M.A., Grehan K., Temperton N., Lambe T., Warimwe G., et al. // *Vaccine.* 2017. V. 35. № 30. P. 3780–3788.
44. Munster V.J., Wells D., Lambe T., Wright D., Fischer R.J., Bushmaker T., Saturday G., van Doremalen N., Gilbert S.C., De Wit E., et al. // *NPJ. Vaccines.* 2017. V. 2. P. 28.
45. Malczyk A.H., Kupke A., Prüfer S., Scheuplein V.A., Hutzler S., Kreuz D., Beissert T., Bauer S., Hubich-Rau S., Tondera C., et al. // *J. Virol.* 2015. V. 89. № 22. P. 11654–11667.
46. Lan J., Deng Y., Song J., Huang B., Wang W., Tan W. // *Virol. Sin.* 2018. V. 33. № 5. P. 453–455.
47. Modjarrad K. // *Vaccine.* 2016. V. 34. № 26. P. 2982–2987.
48. Agrawal A.S., Tao X., Algaissi A., Garron T., Narayanan K., Peng B.H., Couch R.B., Tseng C.T.K. // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016. V. 12. № 9. P. 2351–2356.
49. Coleman C.M., Liu Y.V., Mu H., Taylor J.K., Massare M., Flyer D.C., Glenn G.M., Smith G.E., Frieman M.B. // *Vaccine.* 2014. V. 32. № 26. P. 3169–3174.
50. Haagmans B.L., van den Brand J.M.A., Raj V.S., Volz A., Wohlsein P., Smits S.L., Schipper D., Bestebroer T.M., Okba N., Fux R., et al. // *Science.* 2016. V. 351. № 6268. P. 77–81.
51. Lan J., Deng Y., Chen H., Lu G., Wang W., Guo X., Lu Z., Gao G.F., Tan W. // *PLoS. One.* 2014. V. 9. № 11. P. 1–9.
52. Mou H., Raj V.S., van Kuppeveld F.J.M., Rottier P.J.M., Haagmans B.L., Bosch B.J. // *J. Virol.* V. 87. № 16. P. 9379–9383.
53. Muthumani K., Falzarano D., Reuschel E.L., Tingey C., Flin-gai S., Villarreal D.O., Wise M., Patel A., Izmirly A., Aljuaid A., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2015. V. 7. № 301. P. 1–29.
54. Yang Y., Deng Y., Wen B., Wang H., Meng X., Lan J., Gao G.F., Tan W. // *Viral Immunol.* 2014. V. 27. № 10. P. 543–550.
55. Zhao J., Li K., Wohlford-Lenane C., Agnihothram S.S., Fett C., Zhao J., Gale Jr. M.J., Baric R.S., Enjuanes L., Gallagher T., McCray Jr. P.B., Perlmana S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 13. P. 4970–4975.
56. Iwata-Yoshikawa N., Uda A., Suzuki T., Tsunetsugu-Yokota Y., Sato Y., Morikawa S., Tashiro M., Sata T., Hasegawa H., Nagata N. // *J. Virol.* 2014. V. 88. № 15. P. 8597–8614.
57. Tseng C.T., Sbrana E., Iwata-Yoshikawa N., Newman P.C., Garron T., Atmar R.L., Peters C.J., Couch R.B. // *PLoS. One.* 2012. V. 7. № 4. P. e35421.
58. Tang J., Zhang N., Tao X., Zhao G., Guo Y., Tseng C.T., Jiang S., Du L., Zhou Y. // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015. V. 11. № 5. P. 1244–1250.
59. Lan J., Yao Y., Deng Y., Chen H., Lu G., Wang W., Bao L., Deng W., Wei Q., Gao G.F., et al. // *EBioMedicine.* 2015. V. 2. № 10. P. 1438–1446.