

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ПОЛНОРАЗМЕРНОЙ И МУЛЬТИЭПИТОПНОЙ МРНК-ВАКЦИН ПРОТИВ *M. TUBERCULOSIS* ПО ВЫРАЖЕННОСТИ Т-КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА У МЫШЕЙ

О. О. Васильева¹, В. П. Терещенко¹, Б. Н. Крапивин¹, А. Р. Муслимов^{1,2}, И. С. Кукушкин¹, И. И. Патеев¹, С. А. Рыбцов¹, Р. А. Иванов¹, В. В. Решетников^{1,3}✉

¹ Научный центр трансляционной медицины, Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Разработка новых вакцин против туберкулеза, эффективных в том числе и у взрослых, является актуальной задачей, поскольку ежегодная смертность от этого заболевания во всем мире превышает 1,5 млн случаев. Несмотря на множество исследований в последние десятилетия, эффективной вакцины все еще не получено. Сопrotивляемость туберкулезу состоит из многих факторов, в этом исследовании сделан акцент на Т-клеточном ответе — механизме, позволяющем элиминировать внутриклеточные патогены, такие как *M. tuberculosis*. Целью исследования было разработать мРНК-вакцину, способную формировать выраженный Т-клеточный ответ на антигены *M. tuberculosis*. С помощью анализа *in silico* были выбраны эпитопы секреторного белка ESAT6 (Rv3875) *M. tuberculosis* для дизайна мультиэпитопной мРНК-вакцины. Проведена оценка эффективности Т-клеточного ответа у мышей, иммунизированных мРНК-вакцинами, которые кодируют полноразмерный или мультиэпитопный антиген. Результаты показали, что при иммунизации мультиэпитопной мРНК-вакциной количество IFN γ -секретирующих спленоцитов в ответ на специфичную стимуляцию в два раза выше, в сравнении с количеством IFN γ -секретирующих клеток у мышей, иммунизированных мРНК-вакциной, кодирующей полноразмерный белок. Таким образом, разработанная мультиэпитопная мРНК-вакцина может стать эффективным препаратом для профилактики *M. tuberculosis* посредством формирования выраженного Т-клеточного ответа.

Ключевые слова: мРНК-вакцина, мультиэпитопная вакцина, Т-клеточный ответ, ELISpot

Финансирование: исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-10-2021-113, уникальный идентификатор проекта РФ----193021X0001).

Благодарности: авторы выражают благодарность сотрудникам АНО ВО «Университет «Сириус»: И. М. Теренину за постановку транскрипции *in vitro*, О. В. Заборовой за формуляцию мРНК в липидные наночастицы, М. А. Гавриляк и Е. В. Головину за очистку и характеристику белка Rv3875; Д. В. Шевыреву за постановку эксперимента по внутриклеточному окрашиванию и В. А. Ситиковой за помощь в проведении эксперимента с животными.

Вклад авторов: О. О. Васильева, В. П. Терещенко — клеточные работы, анализ данных, написание статьи, подготовка рисунков; Б. Н. Крапивин, И. И. Патеев, С. А. Рыбцов — клеточные работы, проведение эксперимента с животными, анализ данных; А. Р. Муслимов, И. С. Кукушкин — дизайн конструкций, клонирование; Р. А. Иванов, В. В. Решетников — редактирование текста, анализ данных, координация проекта.

Соблюдение этических стандартов: исследование на животных одобрено этическим комитетом ИЦиГ СО РАН (2022 г.); проведено в соответствии с руководством по уходу и использованию лабораторных животных (2010 г.), Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes (2010 г.), «Правилами надлежащей лабораторной практики» (2016 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Василий Владимирович Решетников
Олимпийский пр-кт, д. 1, г. Сочи, 354340, Россия; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

Статья получена: 24.04.2023 **Статья принята к печати:** 15.06.2023 **Опубликована онлайн:** 29.06.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.021

IMMUNOGENICITY OF FULL-LENGTH AND MULTI-EPILOPE MRNA VACCINES FOR *M. TUBERCULOSIS* AS DEMONSTRATED BY THE INTENSITY OF T-CELL RESPONSE: A COMPARATIVE STUDY IN MICE

Vasileva OO¹, Tereschenko VP¹, Krapivin BN¹, Muslimov AR^{1,2}, Kukushkin IS¹, Pateev II¹, Rybtsov SA¹, Ivanov RA¹, Reshetnikov VV^{1,3}✉

¹ Translational Medicine Research Center, Sirius University of Science and Technology (Autonomous Non-Commercial Higher Education Organization), Sirius, Russia

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

³ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Development of the new tuberculosis vaccines that would be effective in adults is an urgent task: worldwide, the annual death toll of this disease exceeds 1.5 million. In the recent decades, the matter has been addressed in numerous studies, but none has yielded an effective vaccine so far. There are many factors to resistance against tuberculosis; this study focuses on the T-cell response, a mechanism that enables elimination of intracellular pathogens, such as *M. tuberculosis*. We aimed to develop an mRNA vaccine capable of triggering a pronounced T-cell response to the *M. tuberculosis* antigens. The *in silico* analysis allowed us to select epitopes of the *M. tuberculosis* secreted protein ESAT6 (Rv3875) and design a multi-epitope mRNA vaccine thereon. We assessed the intensity of T-cell response in mice immunized with mRNA vaccines that encode a full-length or multi-epitope antigen. The results of this study in mice show that immunization with a multi-epitope mRNA vaccine produces twice as many IFN γ -secreting splenocytes in response to specific stimulation than immunization with an mRNA vaccine encoding the full-length protein. Thus, the developed multi-epitope mRNA vaccine can be an effective *M. tuberculosis* prevention agent the mode of action of which involves formation of a pronounced T-cell response.

Keywords: mRNA vaccine, multi-epitope vaccine, T-cell response, ELISpot

Funding: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement № 075-10-2021-113, unique project identifier RF----193021X0001).

Acknowledgements: the authors express their gratitude to the staff of the Sirius University: Terenin IM for *in vitro* transcription, Zaborova OV for the formulation of mRNA into lipid nanoparticles, Gavrilyak MA and Golovin EV for purification and characterization of the Rv3875 protein; Shevirev DV for setting up the intracellular staining experiment and Sitikova VA for assistance in the context of the animal experiment.

Author contribution: Vasileva OO, Tereschenko VP — work with the cells, data analysis, article authoring, figures authoring; Krapivin BN, Pateev II, Rybtsov SA — work with the cells, animal experiment, data analysis; Muslimov AR, Kukushkin IS — design of structures, cloning; Ivanov RA, Reshetnikov VV — text editing, data analysis, project coordination.

Compliance with the ethical standards: animal study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Cytology and Genetics (2022); carried out in accordance with the laboratory animals care guidelines (2010), Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes (2010), Good Laboratory Practice guidelines (2016).

✉ **Correspondence should be addressed:** Vasily V. Reshetnikov
Olympiyskiy prospekt, 1, Sochi, 354340, Russia; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

Received: 24.04.2023 **Accepted:** 15.06.2023 **Published online:** 29.06.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.021

Ежегодно регистрируется более 10 млн новых случаев заболеваемости туберкулезом и около 1,5 млн смертей. Пандемия COVID-19 тоже внесла свой вклад в распространённость туберкулеза, который развивается на фоне вирусной инфекции — общемировой уровень заболеваемости туберкулезом в 2020 и 2021 гг. повысился на 3–6% по сравнению с предыдущими годами [1]. Несмотря на это, в пандемийные 2020–2021 гг. заболеваемость туберкулезом в РФ снизилась, но в то же время осложнилось его течение. При первом обращении увеличилось количество больных с деструкцией легочной ткани, массивным бактериовыделением и фиброзно-кавернозным туберкулезом [2].

На данный момент единственной одобренной вакциной для профилактики туберкулеза является БЦЖ. БЦЖ используют более 100 лет и помимо туберкулеза она способна обеспечивать неспецифичную защиту против других респираторных и вирусных заболеваний, обеспечивая тренированный иммунитет [3]. В Российской Федерации БЦЖ вводят трехкратно детям, не имеющим противопоказаний после рождения, и помимо протективного действия она способна вызывать ряд поствакцинальных осложнений, таких как воспалительные реакции, проявляющиеся в виде инфильтратов, абцессов, свищей и язв [4]. Недостатком БЦЖ является также то, что эта вакцина не обеспечивает защиту от туберкулеза легких у взрослых [5]. В случае туберкулеза с множественной или широкой лекарственной устойчивостью требуется использовать дорогостоящие и при этом токсичные препараты химиотерапии [6]. С учетом вышесказанного актуальной становится задача поиска новых эффективных вакцин против туберкулеза для подростков и взрослых, в том числе для профилактики и иммунотерапии туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью.

Основная цель вакцинации — предупреждение развития заболевания. В случае туберкулеза Т-клеточный ответ играет ключевую роль в элиминации патогена, и основной эффект вакцинации, обеспечивающий протективное действие против туберкулеза, заключается в формировании CD4⁺-клеток памяти. CD8⁺-клетки, в свою очередь, обеспечивают контроль распространения микобактерий при хроническом туберкулезе. Секретция провоспалительного цитокина IFN γ Т-клетками ассоциируется с протективным действием вакцин [7].

При поиске новых противотуберкулезных вакцин исследователи чаще всего обращаются к субъединичным белковым вакцинам или вирусным векторам [8], но на сегодняшний день исследователи предлагают новые дизайны вакцин на основе мРНК. Так, показана способность самореплицирующейся мРНК вакцины вызывать специфичный ответ CD4⁺- и CD8⁺-клеток [9]. При сравнении с другими типами вакцин мРНК-вакцины обладают рядом преимуществ. Они обеспечивают на порядок более высокий титр антител при сравнении с вакцинами на основе белковых антигенов. При этом стоимость их производства и масштабирования ниже, поскольку для этого используют бесклеточный способ наработки [10]. В сравнении с ДНК-вакцинами, мРНК-вакцины менее генотоксичны, поскольку не способны встраиваться в геном [10], а также более эффективны, поскольку выполняют свою функцию в цитозоле клетки, а не ядре, как ДНК-вакцины, что делает их эффективность не зависимой от этапа клеточного цикла при трансфекции [11].

В случае перехода от аттенуированных вакцин к белковым или к вакцинам на основе нуклеиновых кислот,

возникает проблема выбора эпитопа для иммунизации. Чаще всего используют субъединичные вакцины, которые содержат последовательность одного белка [12], но также есть варианты вакцин, содержащие эпитопы от одного или нескольких антигенов патогена, что может приводить к синергическому иммунному ответу [13]. Подобные вакцины называются мультиэпитопными. Гуморальный и Т-клеточный ответ вызывают разные эпитопы. В-клеточные эпитопы могут быть нелинейными, повторяя нативную конформацию белка, и линейными, в то время как Т-клеточные эпитопы представляют собой короткие пептиды. Использование мультиэпитопных вакцин позволяет индуцировать оба типа иммунных реакций одновременно. Для предсказания эпитопов противотуберкулезных мРНК вакцин активно используют биоинформатические инструменты [14, 15]. При этом использование коротких пептидов в составе мультиэпитопной вакцины позволяет избежать возможных аллергических реакций, появляющихся в случае использования аттенуированных вакцин [16]. Помимо этого, мультиэпитопная вакцина может содержать эпитопы антигенов различных микроорганизмов, что приводит к эффективной иммунизации против нескольких возбудителей одновременно [13].

Однако число экспериментальных работ, в которых сравнивали эффективность мРНК-вакцин, кодирующих полноразмерные и мультиэпитопные варианты антигенов, ограничено. Таким образом, целью нашего исследования было оценить выраженность Т-клеточного ответа у мышей, иммунизированных мРНК-вакцинами, которые кодируют полноразмерный или мультиэпитопный антиген *M. tuberculosis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн эксперимента

В эксперименте были использованы 15 самцов мышей C57BL/6/J в возрасте 8–9 недель SPF-статуса и массой 19–21 г, полученные из Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Содержались в условиях конвенционального вивария при фиксированном световом режиме 12.00 : 12.00 ч. Стандартный корм (гранулы) и воду животные получали без ограничения. Мыши были иммунизированы внутримышечно двумя различными вариантами мРНК-вакцин: mRNA Rv3875 (582 нуклеотида) или mRNA mEpitope (699 нуклеотида) по 50 мкг РНК каждой. Кроме того, мыши были иммунизированы полноразмерным белком Rv3875 (25 мг) в качестве адьюванта, к которому были использованы липидные наночастицы, не содержащие мРНК, в количестве, эквивалентном ($\pm 10\%$) количеству частиц в группах с РНК-вакцинами. Помимо экспериментальных групп, были созданы две контрольные группы: первая — с введением липидных наночастиц без мРНК, вторая — с введением фосфатного буфера. В каждой группе было по три животных. Через четыре недели после первой иммунизации животные были иммунизированы повторно теми же дозами препаратов. Забой мышей и выделение селезенки осуществляли через четыре недели после второй иммунизации (рис. 1).

Выбор эпитопов для мультиэпитопной конструкции Rv3875

Для предсказания эпитопов MHC I использовали пакет MHCFlurry 2.0 версии 2.0.4 [17], для предсказания эпитопов

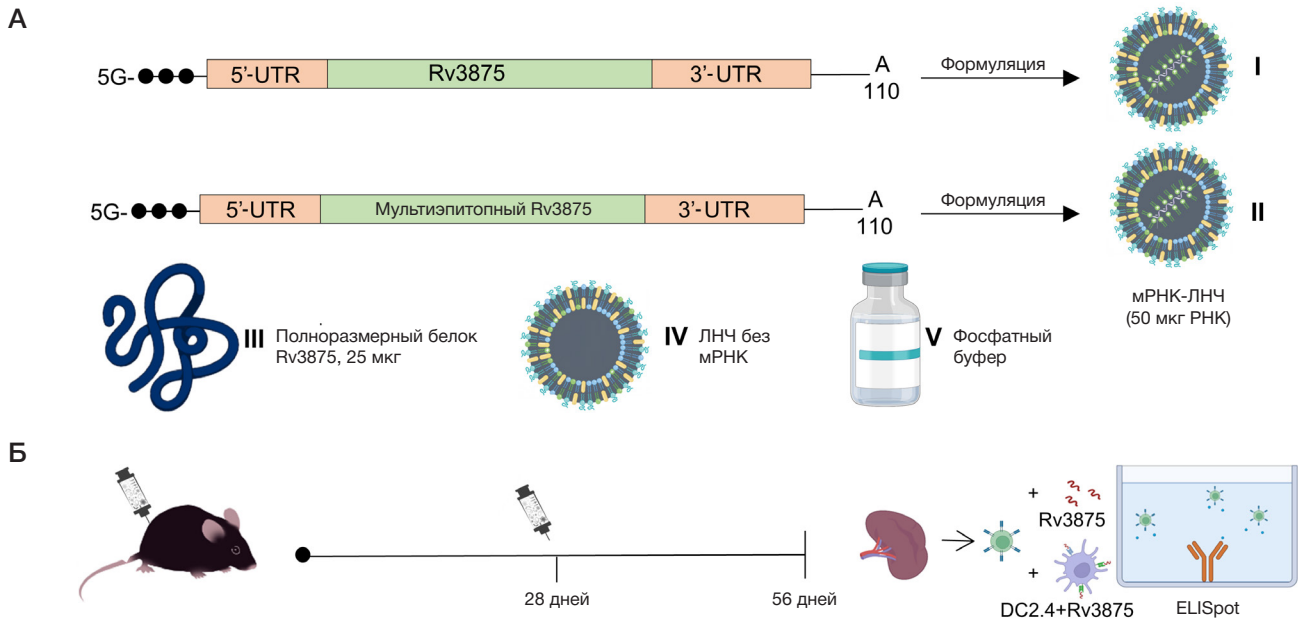


Рис. 1. Дизайн эксперимента. **А.** Схематичное представление состава мРНК-ЛНЧ-вакцины и остальных препаратов. **Б.** Дизайн эксперимента на мышах C57BL6/J. Мыши были иммунизированы внутримышечно двумя различными вариантами мРНК-вакцин: mRNA Rv3875 (582 нуклеотида) или mRNA mEpitope (699 нуклеотида) по 50 мкг РНК каждой. Кроме того, мышам иммунизировали полноразмерным белком Rv3875 (25 мкг), в качестве адьюванта к которому были использованы липидные наночастицы не содержащие мРНК в количестве эквивалентном (\pm) количеству частиц в группах с РНК-вакцинами. Помимо экспериментальных групп, были образованы две контрольные группы: первая с введением липидных наночастиц без мРНК, вторая с введением фосфатного буфера. В каждой группе было по три животных. Через четыре недели после первой иммунизации животные были иммунизированы повторно теми же дозами препаратов. Забой мышам и выделение селезенки осуществляли через четыре недели после второй иммунизации. Уровень сформированного Т-клеточного ответа у вакцинированных мышам определяли по количеству спленоцитов, секретирующих IFN γ в ответ на белок туберкулеза Rv3875 с помощью метода ELISpot

MHC II — пакет NetMHCIIpan 4.1 [18]. Для расчета эпитопов были выбраны опции длины возможных эпитопов: «-length» = 13,14,15,16,17 и «-BA», для того чтобы включить режим предсказания аффинности для пары эпитоп-аллель. Количественные характеристики частот аллелей были получены на основе опубликованных данных [19, 20]. Полученные предсказания результатов MHCFlurry 2.0 и NetMHCIIpan 4.1 отфильтровывали в среде Python 3.9. Каждая пара эпитоп-аллель должна взаимодействовать с аффинностью не более 500 нМ, каждый эпитоп должен связываться как минимум с 5 различными аллелями. С помощью такого алгоритма было отобрано два эпитопа для MHC I (LLDEGKQSL и AAWGGSGSEAY) и три эпитопа для MHC II (WNFAGIEAAASAIQG, KQSLTKLAAAWGGSG и LNNALQNLARTISEA). Финальная конструкция содержала пять эпитопов (по одной копии каждого эпитопа), соединенных между собой линкерами (KK для MHCII и AAY для MHC I). Кроме того, в конструкцию была добавлена последовательность цитоплазматического и трансмембранного домена MHC класса I (IVGIVAGLAV LAVVIGAVVATVMCRRKSSGKGGSSYSQAASSSDSAQGS VSLTA), который обеспечивает колокализацию целевого белка с комплексами гистосовместимости в различных эндоцитарных компартментах [21].

Клонирование

С целью получения конструкций для последующей *in vitro* транскрипции РНК в коммерческий вектор pSmart (Lucigen; США) встраивали кассету, содержащую последовательность 5'-UTR (gggaataagagagaagaagagt aagaagaatataagaccccgccgcccacc), последовательность белка Rv3875 (полноразмерного или мультиэпитопного) и 3'-UTR (gctggagcctcggctggcctagctcttggccctggcctccc cccagccctcctcccctcctcgcacccgctaccccgctgtcttgaataaagctc gactggcgccga). Затем полученную кассету обрабатывали

рестриктазами EcoRI и BglII, очищали на агарозном геле и осуществляли лигирование с аналогично подготовленным коммерческим вектором pSmart (Lucigen; США). Химически компетентные клетки NEB-stable (New England Biolabs; Великобритания) трансформировали лигазной смесью и высевали на LB-агар, содержащий ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Колонии на наличие вставки проверяли методом ПЦР. Верификацию плазмид осуществляли секвенированием по Сэнгеру. Анализ хроматограмм секвенирования проводили с помощью программы Ugene v38.1. *E. coli* NEB-stable с вектором культивировали при 30 °C и 180 rpm. Выделение и очистку плазмидной ДНК проводили с использованием набора QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen; США). Для получения линеаризованной плазмиды препарат обрабатывали рестриктазой SpeI по уникальному сайту рестрикции, расположенному после поли(A)-хвоста.

Для получения конструкции и наработки полноразмерного белка Rv3875 использовали вектор pET30 (Agilent; США). Последовательность Rv3875 с дополнительной последовательностью для шести гистидинов на N-конце была собрана из олигонуклеотидов с помощью ПЦР. Полученную кассету обрабатывали рестриктазами EcoRI и NdeI, очищали на агарозном геле и осуществляли лигирование с аналогично подготовленным коммерческим вектором pET30 (Agilent; США). Для трансформации использовали клетки BL21DE3 (Agilent; США). Верификацию плазмид осуществляли секвенированием по Сэнгеру.

In vitro транскрипция мРНК

In vitro транскрипцию проводили, как описано ранее [22]. Использовали 5 мкг линеаризованной плазмиды, буфер (20 mM DTT, 2 mM спермидина, 80 mM HEPES-КОН pH 7,4, 24 mM MgCl₂), 500 единиц T7 РНК-полимеразы («Биолабмикс»;

Россия), 200 единиц ингибитора рибонуклеаз RiboCare («Евроген»; Россия) и 1 мкл смеси ферментов из набора RiboMAX Large Scale RNA Production System (Promega; США) в качестве источника неорганической пирофосфатазы. Реакционная смесь содержала также 12 мМ аналога кэпа ARCA («Биолабмикс»; Россия) и по 3 мМ каждого из рибонуклеозид трифосфатов («Биосан»; Россия). Реакцию проводили 2 ч при температуре 37 °С, после чего добавляли еще по 3 мМ каждого из рибонуклеозид трифосфатов и инкубировали в течение еще 2 ч. ДНК гидролизовали при помощи нуклеазы RQ1 (Promega; США), РНК преципитировали добавлением LiCl до концентрации 0,32 М и EDTA pH 8,0 до концентрации 20 мМ с последующей инкубацией на льду в течение часа. Далее раствор центрифугировали в течение 15 мин (25 000 g при 4°C). Осадок РНК промывали 70%-м этанолом, растворяли в ультрачистой воде и еще раз преципитировали спиртом по стандартной методике. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 260 нм. Целевую длину и гомогенность синтезированных РНК молекул оценивали с помощью капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent; США).

Формуляция мРНК в ЛНЧ

Формулирование мРНК в липидные наночастицы проводили путем смешивания водного раствора (10 мМ цитратный буфер, pH 3,0) 0,2 мг/мл мРНК со спиртовым раствором смеси липидов в микрофлюидном картридже на приборе The NanoAssemblr™ Benchtop (Precision Nanosystems; США). Липидная смесь содержала следующие компоненты: ионизируемый липидоид ALC-0315 (BroadPharm; США), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) (Avanti Polar Lipids; США), холестерин (Sigma-Aldrich; США), DMG-PEG-2000 (BroadPharm; США) в молярном соотношении (%) 46,3 : 9,4 : 42,7 : 1,6. Массовая доля мРНК в ЛНЧ составляла 0,04% масс. Для формирования частиц водную и спиртовую фазы смешивали в соотношении 3 : 1 по объему с общей скоростью смешивания 10 мл/мин.

Затем частицы фильтровали в стерильных условиях через фильтр с мембраной из PES 0,22 мкм (Merck; США) и хранили при 4 °С. После фильтрации качество полученных частиц анализировали по двум параметрам: размер частиц (Zetasizer Nano ZSP, Malvern Panalytical; США) и загрузки мРНК. Концентрацию загруженной в липидные наночастицы мРНК определяли по разнице значений уровня флуоресцентного сигнала при окрашивании реагентом RiboGreen (Thermo Fischer Scientific; США) суспензии частиц до их разрушения и после. Для разрушения частиц использовали детергент Triton X-100 (Sigma-Aldrich; США).

Наработка и очистка белка Rv3875

Для наработки белка *E. coli* BL21DE3 с вектором культивировали при 37 °С и 180 rpm до $OD_{600} = 0,65$. Затем добавляли ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и культивировали клетки 6 ч при 30 °С. Клетки ресуспендировали в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl pH 8,0 и 300 мМ хлорида натрия. Далее проводили лизис клеток ультразвуком с длительностью импульса 15 с и промежутком между импульсами 15 с. Амплитуда ультразвуковых колебаний составляла 50% от максимальной. После лизиса образцы центрифугировали

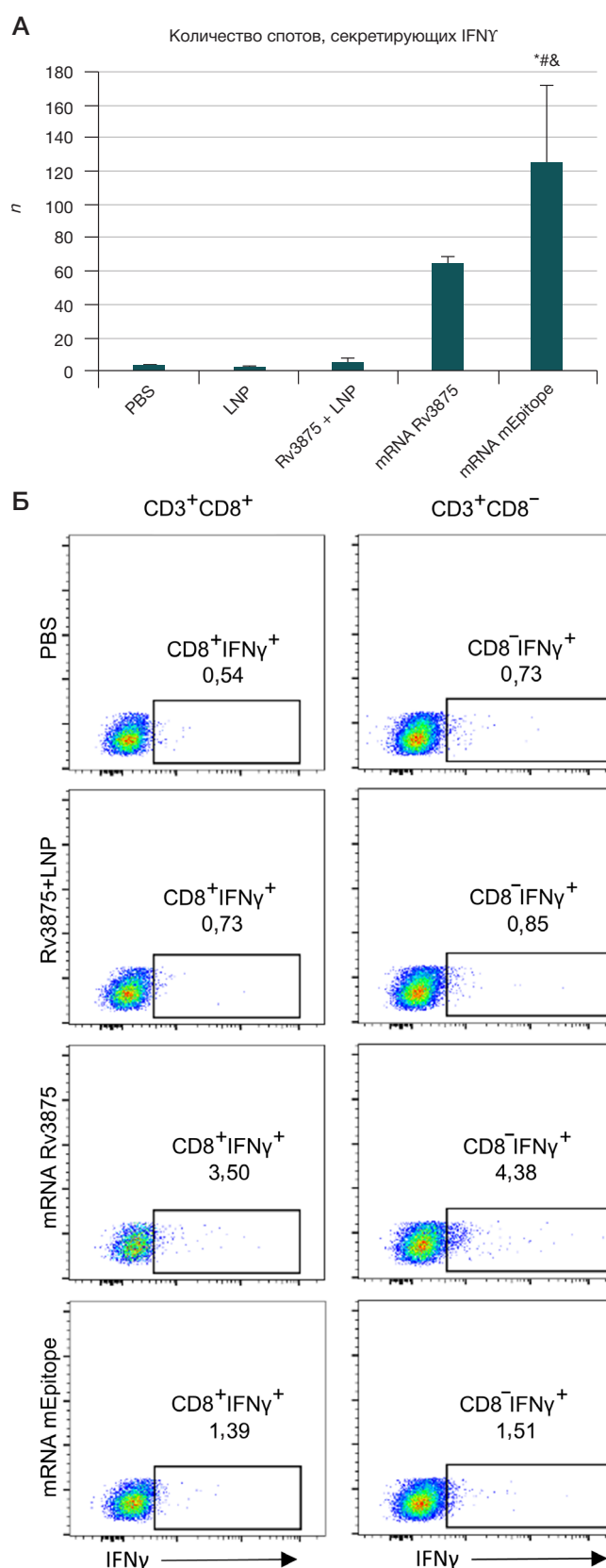


Рис. 2. Оценка Т-клеточного ответа спленоцитов иммунизированных мышей. **А.** Результаты ELISpot. Количество клеток, секретирующих IFN γ в ответ на стимуляцию DC2.4, активированных белком Rv3875. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего. По три животных в группе. * — $p < 0,05$ по сравнению с группой PBS; # — $p < 0,05$ по сравнению с группой LNP; & — $p < 0,05$ по сравнению с группой Rv3875 + LNP. **Б.** Репрезентативные данные по внутриклеточному окрашиванию CD3⁺-Т-лимфоцитов (CD8⁺ и CD8⁻), продуцирующих IFN γ . Цифры показывают процент клеток от общего пула CD3⁺CD8⁻- и CD3⁺CD8⁺-Т-лимфоцитов, которые продуцируют IFN γ .

в течение 15 мин (20 000 g при 4 °C). pH полученного после центрифугирования супернатанта доводили до 7,5 путем добавления раствора 1 M Tris-OH. Затем испытуемый образец подвергали фильтрации через полиэфирсульфоновую мембрану с диаметром пор 0,22 мкм.

Первый этап очистки белка Rv3875 осуществляли с использованием металлохелатного аффинного сорбента со средним размером частиц 30 мкм. На сорбент с иммобилизованным хелатирующим лигандом (нитрилтриуксусной кислотой) наносили лизат клеток и элюировали в градиенте имидазола. Затем фракции очищенного белка диализовали против буфера, содержащего 25 mM Tris-HCl. Диализованный образец наносили на сильный катионообменный сорбент со средним размером частиц 45 мкм и иммобилизованными на них функциональными сульфогруппами ($-SO_3^-$). Массу Rv3875 проверяли как с помощью классического метода электрофореза в полиакриламидном геле, так и с помощью масс-спектрометра maxis 4G ETD (Bruker; США).

Оценка уровня Т-клеточного ответа после вакцинации

Уровень сформированного Т-клеточного ответа у вакцинированных мышей определяли по количеству спленоцитов, секретирующих IFN γ в ответ на белок туберкулеза Rv3875 с помощью метода ELISpot.

Из селезенок вакцинированных и контрольных мышей выделяли спленоциты протиранием через фильтр 70 мкм. Спленоциты высаживали в количестве 300 тыс. клеток (BD; США) в ELISpot планшеты с PVDF-мембраной с одновременной стимуляцией. Стимуляцию осуществляли белком Rv3875 (50 мкг/мл) и дендритными клетками линии DC2.4 в количестве 30 тыс. клеток на лунку. Каждую экспериментальную лунку ставили в двух технических повторах. После посадки спленоцитов и добавления стимуляторов суммарный объем лунки составлял 200 мкл питательной среды RPMI-1640 («ПанЭко»; Россия) с 10% FCS. Далее спленоциты культивировали 18 ч в CO $_2$ -инкубаторе (5% CO $_2$, 37 °C).

По истечении срока культивирования спленоциты, секретирующие IFN γ , выявляли с помощью наборов Mouse IFN γ ELISpot Set (BD; США) и AEC Substrate Set (BD; США), согласно инструкции производителя. Подсчет точек, соответствующих спленоцитам, секретирующим IFN γ , производили на приборе S6 Ultra (CTL; США).

Цитометрическое определение IFN-продуцирующих клеток

Для цитометрического определения IFN γ -продуцирующих клеток спленоциты вакцинированных мышей высаживали в 200 мкл среды RPMI-1640 в культуральный 96-луночный планшет в количестве 300 тыс. на лунку и стимулировали белком Rv3875 (50 мкг/мл) или оставляли нестимулированными. Через 2 ч после начала стимуляции в лунки добавляли Брефелдин А (Abcam; США) в концентрации 10 мкг/мл. Далее клетки культивировали ночь в CO $_2$ -инкубаторе. По окончании инкубации клетки окрашивали анти-CD3 (PE Anti-Mouse CD3, Elabscience) и CD8-антителами (FITC Anti-Mouse CD8a, Elabscience) в концентрации согласно инструкции производителя, фиксировали и пермеабелизировали коммерческим набором (BD; США) согласно инструкции производителя. Полученные пробы анализировали на проточном цитометре LSRFortessa (BD; США). Пример

гейтирования представлен в Приложении 1. Полученные данные обрабатывали в программе FlowJo (Treestar Inc.; США).

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили, используя однофакторный дисперсионный анализ ANOVA и Turkey's-тест в качестве post-hoc-анализа. Различия между экспериментальными группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Анализ данных производили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (Statsoft Inc.; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ Т-клеточного ответа методом ELISpot на IFN γ -секретирующие клетки показал эффективность вакцинации [$F(10,4) = 6,02; p = 0,012$]. Количество IFN γ -секретирующих клеток в ответ на стимуляцию DC2.4+Rv3875 было выше в спленоцитах мышей, вакцинированных мультиэпитопным вариантом мРНК-вакцины (mRNA mEpitope) по сравнению с контрольными группами (PBS, LNP) или спленоцитами мышей, иммунизированных белком Rv3875 с наночастицами без РНК (Rv3875+LNP) (рис. 2А). Количество IFN γ -секретирующих клеток среди спленоцитов мышей, иммунизированных мРНК-вакциной, кодирующей полноразмерный белок Rv3875, было также выше, чем у контроля ($64 \pm 2,7$ vs $2,5 \pm 1,0$) однако эти изменения статистически не достоверны. Следует отметить, что спленоциты мышей, иммунизированных белком Rv3875 с «пустыми» ЛНЧ без мРНК, демонстрировали лишь незначительное увеличение IFN γ -секретирующих клеток по сравнению со спленоцитами после иммунизации мРНК-вакцинами (Rv3875: $5,7 \pm 1,8$; mRNA Rv3875: $64,0 \pm 2,7$; mRNA mEpitope: $126,0 \pm 46,2$). Данные по спленоцитам отдельных животных представлены в Приложении 2.

Цитометрическое исследование было проведено на спленоцитах одного животного из каждой группы. Поэтому отсутствует статистическая обработка данных, результаты приведены для наглядности. По нашим данным, процент Т-лимфоцитов CD3 $^+$ CD8 $^+$ и CD3 $^+$ CD8 $^-$, продуцирующих IFN γ , выше в спленоцитах мышей, иммунизированных мРНК-вакцинами (рис. 2Б). Таким образом, данные по цитометрии подтверждают, что повышенная секреция IFN γ в спленоцитах мышей, вакцинированных mRNA Rv3875 и mRNA mEpitope, обеспечивается в том числе за счет Т-лимфоцитов, что говорит о формировании Т-клеточного ответа на антигены микобактерии туберкулеза у вакцинированных мышей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наши результаты показали, что иммунизация мРНК-вакциной, кодирующей мультиэпитопный белок Rv3875 (ESAT6) *M. tuberculosis*, приводит к более выраженному Т-клеточному ответу, как по сравнению с иммунизацией мРНК-вакциной, кодирующей полноразмерный вариант белка, так и по сравнению с иммунизацией рекомбинантным белком. Эти результаты могут быть вызваны как более эффективной презентацией эпитопов комплексами гистосовместимости I и II типов, так и связаны с выбором наиболее иммуногенных эпитопов [11]. Повышение эффективности презентации может быть обусловлено правильным расщеплением белковой молекулы по протеосомному и лизосомному

пути, которое обеспечивается путем добавления последовательностей расщепляющихся линкеров [23]. Кроме того, на иммуногенность оказывают влияние лидерные последовательности. В качестве такой последовательности мы использовали последовательность цитоплазматического и трансмембранного домена МНС класса I на карбоксильном конце белковой молекулы. Ранее было показано, что лидерная последовательность с транспортным сигналом МНС класса I обеспечивает ко-локализацию целевого белка с комплексами гистосовместимости в различных эндоцитарных компартментах и, как результат, приводит к эффективной активации и экспансии антиген-специфичных CD8⁺- и CD4⁺-Т-клеток [21].

Еще одним несомненным преимуществом мультиэпитопных вакцин является возможность «настройки» Т-клеточного ответа за счет выбора специфичных эпитопов. В нашем исследовании мы использовали вакцину, кодирующую пять эпитопов Rv3875, три из которых презентуются с помощью МНС класса II и два с помощью МНС класса I, что обеспечивает специфичную активацию CD8⁺- и CD4⁺-Т-клеток. Несмотря на то что эпитопы были отобраны по сродству к человеческим аллелям, а не мышинным, мультиэпитопная мРНК-вакцина все равно показала высокую эффективность, вероятно, за счет высокой межвидовой кросс-реактивности. Т-клеточный ответ вносит основной вклад в борьбу с *M. tuberculosis*. CD8⁺-Т-лимфоциты способны уничтожать инфицированные фагоцитирующие клетки при помощи белков перфорина, гранзима и гранулизина, а также индукции апоптоза через FasL-рецептор, при этом секретируемый гранулизин может непосредственно вызывать гибель *M. tuberculosis*. Важнейшей функцией CD4⁺-клеток при борьбе с *M. tuberculosis* является выработка IFN γ , активирующего макрофаги и цитотоксические Т-лимфоциты. Сниженная эффективность БЦЖ у некоторых индивидов может быть связана с недостаточной индукцией CD8⁺-Т-клеток [24].

Использование мРНК вакцин против туберкулеза было также продемонстрировано в двух экспериментальных

работах, которые показали непоследовательные результаты [9, 25]. В исследовании по разработке противотуберкулезной мРНК-вакцины на основе полноразмерного MPT83-антигена были обнаружены иммуногенные свойства такой вакцины [25]. При иммунизации она была способна вызывать выработку специфичных антител. Т-клетки, выделенные из селезенки мышей, секретировали IFN γ в ответ на стимуляцию антигеном, а CTL были способны лизировать трансфецированные антигеном клетки, что согласуется с полученными нами результатами. В аналогичном исследовании 2022 г. использовали мРНК ID91, содержащую четыре туберкулезных полноразмерных антигена, слитых с синтетическим агонистом TLR4, причем мРНК являлась самореплицирующейся [9]. Сравнение такой мРНК вакцины с белковой вакциной показало аналогичное увеличение титра антител, но менее выраженный Т-клеточный ответ. В нашем исследовании впервые была использована мультиэпитопная мРНК вакцина против туберкулеза. Результаты показали более выраженные эффекты по сравнению с полноразмерной мРНК-вакциной. Вероятно, дальнейшее использование мультиэпитопных вакцин для профилактики туберкулеза может быть более перспективно по сравнению с белковыми и полноразмерными мРНК-вакцинами.

ВЫВОДЫ

Мультиэпитопная мРНК-вакцина приводит к выраженному Т-клеточному ответу у мышей при внутримышечном способе введения. Усиление Т-клеточного ответа может быть ключевым в разработке эффективной профилактической вакцины против *M. tuberculosis*. Вакцины к новым эпитопам туберкулеза могли бы усилить Т-клеточный ответ и ускорить вовлечение клеток адаптивного иммунитета в иммунный ответ в первые две недели заражения, обеспечивая более эффективную элиминацию патогена. Таким образом, мультиэпитопные вакцины на основе мРНК-молекул могут иметь хороший потенциал для разработки эффективной вакцины против *M. tuberculosis*.

Литература

1. Dartois VA, Rubin EJ. Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities. *Nat Rev Microbiol*. 2022; 20 (11): p. 685–701.
2. Васильева И. А., Тестов В. В., Стерликов С. А. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в годы пандемии COVID-19–2020–2021 гг. *Туберкулез и болезни легких*. 2022. 100 3: 6–12.
3. Ahmed A, et al. A century of BCG: Impact on tuberculosis control and beyond. *Immunological reviews*. 2021; 301 (1): 98–121.
4. Шалюфаст Е. И., Ершова Ю. И. Поствакцинальные осложнения при «БЦЖ» иммунизации. *Вестник науки*. 2022; 4, 11 (56): 341–55.
5. Covian, C., et al., BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design. *Front Immunol*. 2019; 10: 2806.
6. Николенко Н. Ю., Кудлай Д. А., Докторова Н. П. Фармакоэпидемиология и фармакоэкономика туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. *Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. 2021; 14 (2): 235–48.
7. Counoupas C, Triccas JA. The generation of T-cell memory to protect against tuberculosis. *Immunol Cell Biol*. 2019; 97 (7): 656–63.
8. Bouzeyen R, Javid B, Therapeutic Vaccines for Tuberculosis: An Overview. *Front Immunol*. 2022; 13: 878471.
9. Larsen SE, et al. An RNA-based vaccine platform for use against *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccines*. 2023; 11 (1): 130.
10. Tian Y, Deng Z, Yang P. mRNA vaccines: A novel weapon to control infectious diseases. *Front Microbiol*. 2022; 13: 1008684.
11. Melo A, et al. Third-generation vaccines: features of nucleic acid vaccines and strategies to improve their efficiency. *Genes (Basel)*. 2022; 13 (12).
12. Heidary M, et al. A comprehensive review of the protein subunit vaccines against COVID-19. *Front Microbiol*. 2022; 13: 927306.
13. Teran-Navarro H, et al. A comparison between recombinant listeria GAPDH proteins and GAPDH encoding mRNA conjugated to lipids as cross-reactive vaccines for *Listeria*, *Mycobacterium*, and *Streptococcus*. *Front Immunol*. 2021; 12: 632304.
14. Al Tbeishat H. Novel in silico mRNA vaccine design exploiting proteins of *M. tuberculosis* that modulates host immune responses by inducing epigenetic modifications. *Scientific Reports*. 2022. 12 (1): 1–19.
15. Shahrear S, Islam ABMMK. Modeling of MT. P495, an mRNA-based vaccine against the phosphate-binding protein PstS1 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Diversity*. 2022; 1–20.
16. Kar T, et al. A candidate multi-epitope vaccine against SARS-

- CoV-2. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 10895.
17. O'Donnell TJ, Rubinsteyn A, Laserson U. MHCflurry 2.0: improved pan-allele prediction of MHC class I-presented peptides by incorporating antigen processing. *Cell Syst.* 2020; 11 (1): 42–48.
 18. Reynisson B, et al. Improved prediction of MHC II antigen presentation through integration and motif deconvolution of mass spectrometry MHC eluted ligand data. *J Proteome Res.* 2020; 19 (6): 2304–15.
 19. Greenbaum J, et al. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. *Immunogenetics.* 2011; 63 (6): 325–35.
 20. Weiskopf D, et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110 (22): E2046–53.
 21. Kreiter S, et al. Increased antigen presentation efficiency by coupling antigens to MHC class I trafficking signals. *J Immunol.* 2008; 180 (1): 309–18.
 22. Kirshina A, Kolosova E, Imasheva E, Vasileva O, Zaborova O, Terenin I, et al. Effects of various mRNA-LNP vaccine doses on neuroinflammation in BALB/c mice. *RSMU.* 2022; 6.
 23. Yano A, et al. An ingenious design for peptide vaccines. *Vaccine.* 2005; 23 (17–18): 2322–6.
 24. Hess J, Kaufmann SH. Live antigen carriers as tools for improved anti-tuberculosis vaccines. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999; 23 (2): 165–73.

References

1. Dartois VA, Rubin EJ. Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities. *Nat Rev Microbiol.* 2022. 20 (11): p. 685–701.
2. Vasileva IA, Testov VV, Sterilikov SA. Ehpidemicheskaya situaciya po tuberkulezu v gody pandemii COVID-19–2020-2021 gg. Tuberkulez i bolezni legkix. 2022. 100 3: 6–12. Russian.
3. Ahmed A, et al. A century of BCG: Impact on tuberculosis control and beyond. *Immunological reviews.* 2021; 301 (1): 98–121.
4. Shalofast EI, Ershova Yul. Postvakkinal'nye oslozhneniya pri «BCZh» immunizacii. *Vestnik nauki.* 2022; 4, 11 (56): 341–55. Russian.
5. Covian C., et al., BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design. *Front Immunol.* 2019; 10: 2806.
6. Nikolenko NYu, Kudlaj DA, Doktorova NP. Farmakoehpidemiologiya i farmakoehkonomika tuberkuleza s mnozhestvennoj i širokoj lekarstvennoj ustojchivost'yu vozbuditelya. *Farmakoehkonomika. Sovremennaya farmakoehkonomika i farmakoehpidemiologiya.* 2021; 14 (2): 235–48. Russian.
7. Counoupas C, Triccas JA. The generation of T-cell memory to protect against tuberculosis. *Immunol Cell Biol.* 2019; 97 (7): 656–63.
8. Bouzeyen R, Javid B, Therapeutic Vaccines for Tuberculosis: An Overview. *Front Immunol.* 2022; 13: 878471.
9. Larsen SE, et al. An RNA-based vaccine platform for use against *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccines.* 2023; 11 (1): 130.
10. Tian Y, Deng Z, Yang P. mRNA vaccines: A novel weapon to control infectious diseases. *Front Microbiol.* 2022; 13: 1008684.
11. Melo A, et al. Third-generation vaccines: features of nucleic acid vaccines and strategies to improve their efficiency. *Genes (Basel).* 2022; 13 (12).
12. Heidary M, et al. A comprehensive review of the protein subunit vaccines against COVID-19. *Front Microbiol.* 2022; 13: 927306.
13. Teran-Navarro H, et al. A comparison between recombinant listeria GAPDH proteins and GAPDH encoding mRNA conjugated to lipids as cross-reactive vaccines for *Listeria*, *Mycobacterium*, and *Streptococcus*. *Front Immunol.* 2021; 12: 632304.
14. Al Tbeishat H. Novel in silico mRNA vaccine design exploiting proteins of *M. tuberculosis* that modulates host immune responses by inducing epigenetic modifications. *Scientific Reports.* 2022. 12 (1): 1–19.
15. Shahrear S, Islam ABMMK. Modeling of MT. P495, an mRNA-based vaccine against the phosphate-binding protein PstS1 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Diversity.* 2022; 1–20.
16. Kar T, et al. A candidate multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 10895.
17. O'Donnell TJ, Rubinsteyn A, Laserson U. MHCflurry 2.0: improved pan-allele prediction of MHC class I-presented peptides by incorporating antigen processing. *Cell Syst.* 2020; 11 (1): 42–48.
18. Reynisson B, et al. Improved prediction of MHC II antigen presentation through integration and motif deconvolution of mass spectrometry MHC eluted ligand data. *J Proteome Res.* 2020; 19 (6): 2304–15.
19. Greenbaum J, et al. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. *Immunogenetics.* 2011; 63 (6): 325–35.
20. Weiskopf D, et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110 (22): E2046–53.
21. Kreiter S, et al. Increased antigen presentation efficiency by coupling antigens to MHC class I trafficking signals. *J Immunol.* 2008; 180 (1): 309–18.
22. Kirshina A, Kolosova E, Imasheva E, Vasileva O, Zaborova O, Terenin I, et al. Effects of various mRNA-LNP vaccine doses on neuroinflammation in BALB/c mice. *RSMU.* 2022; 6.
23. Yano A, et al. An ingenious design for peptide vaccines. *Vaccine.* 2005; 23 (17–18): 2322–6.
24. Hess J, Kaufmann SH. Live antigen carriers as tools for improved anti-tuberculosis vaccines. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999; 23 (2): 165–73.