

4. Kim M.C., Kwon J.K., Joh S.J., Kwon J.H., Kim J.H., Kim S.J. Development of one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction to detect duck hepatitis virus type 1. *Avian Disease*. 2007; 51(2): 540-5.
5. Tseng C.H., Knowles N.J., Tsai H.J. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus. *Virus Res*. 2007; 123(2): 190-203.
6. Wang L., Pan M., Fu Y., Zhang D. Classification duck hepatitis virus in to three genotypes bases on molecular evolutionary analysis. *Virus Genes*. 2008; 37(1): 52-9.
7. Vinokhodov O.V., Vinokhodov V.O., Vinokhodov D.O. Enterovirus hepatitis of ducks of I type. In: Sorinson S.N., ed. *Viral Hepatitis of Birds [Virusnye gepatity ptits]*. St. Petersburg; 1998; 68-91. (in Russian)
8. Bubashko O.A. Marker properties of the strain of viral hepatitis of ducklings KMIEV-16. *Epizootologiya, immunologiya, farmakologiya i sanitariya*. 2005; (1): 46-9. (in Russian)
9. Davis D. Temperature and pH stability of duck hepatitis virus. *Avian Pathol*. 1987; 16(1): 21-30.
10. Knyazev V.P. Viral hepatitis of ducks (ducks). In: Knyazev V.P. *Diseases of Waterfowl [Bolezni vodoplavayushchikh ptits]*. Vladimir; 2010; 70-87. (in Russian)
11. Syurin V.N., Belousova R.V., Fomina N.V. *Veterinary Virology [Veterinarnaya virusologiya]*. Moscow: Agropromizdat; 1991. (in Russian)
12. Ashmarin I.P., Vasil'ev N.N., Ambrosova V.A. *Fast Methods of Statistical Processing and Experiment Planning [Bystrye metody statisticheskoy obrabotki i planirovaniya eksperimentov]*. Leningrad; 1975. (in Russian)
13. Lezova T.A., Mikhailishin V.V. Virulicidal activity of ethylenimine coordination compounds against viruses. In: *Materials of the International Scientific Conference, Dedicated to the 45th Anniversary of the FGI «VNIIZH» [Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii, posvyashchennoy 45-letiyu FGU «VNIIZH»]*. Vladimir; 2003; 483-7. (in Russian)
14. Ulupov N.A., Mikhailishin V.V., Gusev A.A., Lezova T.A. Aminoethyl-ethylenimine is a means of inactivating the infectivity of the foot and mouth disease virus. In: *Materials of the International Scientific Conference, Dedicated to the 45th Anniversary of the FGI «VNIIZH» [Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii, posvyashchennoy 45-letiyu FGU «VNIIZH»]*. Vladimir; 1998; 53-62. (in Russian)
15. Borisova I.A. Antigenic activity of experimental inactivated emulsion vaccine against Newcastle disease and pneumovirus infection of birds. *Veterinarnaya patologiya*. 2006; (4): 144-6. (in Russian)
16. Gleyzer D.A., Frolov S.V., Borisov A.V., Kulakov V.Yu. Obtaining an inactivated virus of chicken infectious bronchitis (strain "Kaluzhsky"). *Veterinarnaya patologiya*. 2008; (4): 75-9. (in Russian)

Поступила 24.10.17
Принята в печать 12.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 578.891:578.51.083.33

Куприянов В.В.¹, Николаева Л.И.², Зыкова А.А.¹, Махновский П.И.², Котляров Р.Ю.¹, Васильев А.В.², Равин Н.В.¹

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ МОЗАИЧНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ АНТИГЕНОВ NS4A И NS4B ВИРУСА ГЕПАТИТА С

¹ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, г. Москва;

²Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Цель исследования – изучить иммуногенные свойства мозаичных рекомбинантных белков, сконструированных на основе антигенов NS4A и NS4B вируса гепатита С (ВГС). Методами генной инженерии в системе *E. coli* были получены 4 мозаичных рекомбинантных белка, содержащих Т- и В-эпитопы антигенов NS4A и NS4B. Для усиления иммунного ответа они были соединены в различных вариантах с нуклеотидной последовательностью мышинного интерлейкина-2 (IL-2), липопептида *Neisseria meningitidis* и Т-хелперного эпитопа нуклеокапсидного белка ВГС. Иммуногенные свойства этих рекомбинантных белков были изучены методами иммуноблоттинга, иммуноферментного анализа и ELISpot с использованием сывороток иммунизированных мышей и инфицированных ВГС людей. Рекомбинантные белки специфически реагировали в иммуноблоттинге с сыворотками иммунизированных мышей и инфицированных пациентов. По данным иммуноферментного анализа, наблюдалось преимущественное образование антител к NS4B при иммунизации мышей рекомбинантным белком, содержащим оба антигена. Анализ продукции гамма-интерферона Т-лимфоцитами при контакте с активированными дендритными клетками в ELISpot показал, что максимальная продукция этого цитокина отмечалась при расположении адъювантных компонентов на N- и C-концах рекомбинантного белка. Наивысший уровень продукции гамма-интерферона при стимуляции этим препаратом был выявлен в лимфоцитах из костного мозга и лимфатических узлов. Среди проанализированных четырех препаратов наибольшее иммуностимулирующее действие оказывал рекомбинантный мозаичный белок, содержащий Т- и В-эпитопы NS4A и NS4B, мышиный IL-2 и липопептид *Neisseria meningitidis*. Этот рекомбинантный белок образовывал наночастицы размером 100–120 нм.

Ключевые слова: антигены вируса гепатита С; рекомбинантные мозаичные белки; адъювантные компоненты.

Для цитирования: Куприянов В.В., Николаева Л.И., Зыкова А.А., Махновский П.И., Котляров Р.Ю., Васильев А.В., Равин Н.В. Иммуногенные свойства рекомбинантных мозаичных белков на основе антигенов NS4A и NS4B вируса гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(3): 138-143

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-138-143>

Koupriyanov V.V.¹, Nikolaeva L.I.², Zyikova A.A.¹, Makhnovskiy P.I.², Kotlyarov R.Y.¹, Vasilyev A.V.², Ravin N.V.¹ IMMUNOGENIC PROPERTIES OF RECOMBINANT MOZAIC PROTEINS BASED ON ANTIGENS NS4A AND NS4B OF HEPATITIS C VIRUS

¹Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Moscow, 119071, Russian Federation;

²D.I. Ivanovsky Institute of Virology, «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

Для корреспонденции: Куприянов Виктор Васильевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории систем молекулярного клонирования Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии», 119071, г. Москва.
E-mail: vkoop@biengi.ac.ru

The aim of the study was to investigate immunogenic properties of mosaic recombinant proteins constructed on the data of hepatitis C virus NS4A and NS4B antigens. Four mosaic recombinant proteins, containing the T and B epitopes of the NS4A and NS4B antigens, were created by genetic engineering methods in the *E. coli* system. To enhance the immune response they were linked in different variations to the nucleotide sequences of murine interleukin-2 (IL-2), the *Neisseria meningitidis* lipopeptide, and the T helper epitope of the core protein of hepatitis C virus. The immunogenic properties of these recombinant proteins were analyzed by immunoblotting, ELISA and ELISpot using sera from immunized mice and patients infected with hepatitis C virus. Recombinant proteins specifically reacted with the sera of immunized mice and infected patients in immunoblotting. According to the ELISA data, the predominant formation of antibodies to NS4B was observed when mice were immunized with the recombinant proteins containing both antigens. Analysis of gamma-interferon production by T-lymphocytes upon contact with activated dendritic cells showed in ELISpot that the maximum production of this cytokine was detected when adjuvant components were located at the N- and C-ends of the recombinant protein. The highest level of gamma-interferon production during stimulation with this drug was detected in lymphocytes from the bone marrow and lymph nodes. The recombinant protein containing the T and B epitopes of NS4A and NS4B, murine IL-2 and the lipopeptide *Neisseria meningitidis* had the greatest immunostimulate effect among the four constructions. This recombinant protein formed nanoparticles of 100-120 nm in size.

Key words: hepatitis C virus antigens; recombinant mosaic proteins; adjuvant components.

For citation: Koupriyanov V.V., Nikolaeva L.I., Zykova A.A., Makhnovskiy P.I., Kotlyarov R.Y., Vasilyev A.V., Ravin N.V. Immunogenic properties of recombinant mosaic proteins based on antigens NS4A and NS4B of hepatitis C virus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(3): 138-143. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-138-143>

For correspondence: Victor V. Koupriyanov, PhD in biology, senior researcher of laboratory of system of molecular cloning of Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Moscow, 119071, Russian Federation. E-mail: vkooop@biengi.ac.ru

Information about authors:

Koupriyanov V.V., <http://orcid.org/0000-0002-8602-1974>;

Zykova A.A., <http://orcid.org/0000-0001-9577-4815>;

Kotlyarov R.Y., <http://orcid.org/0000-0002-4387-2592>;

Ravin N.V., <http://orcid.org/0000-0002-1456-1832>

Nikolaeva L.I., <http://orcid.org/0000-0002-1323-5568>;

Makhnovskiy P.I., <http://orcid.org/0000-0002-5859-0360>;

Vasilyev A.V., <http://orcid.org/0000-0001-7641-9906>;

Acknowledgment. This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 16-04-00450).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 10 November 2017
Accepted 12 December 2017

Введение

Вирусный гепатит С – распространённое инфекционное заболевание, для которого характерно частое развитие хронической формы инфекции с постепенным поражением печени и развитием у части больных цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы. С конца прошлого века во многих странах проводятся исследования с целью создания профилактических и терапевтических вакцин против гепатита С. Зарегистрированных вакцин пока нет, кандидатные вакцинные препараты проходят испытания [1].

Процесс формирования иммунного ответа на антигены вируса состоит из цепи событий: дендритные клетки захватывают антигены и расщепляют их на пептидные эпитопы, которые связываются с белками главного комплекса гистосовместимости и презентуются на поверхности дендритных клеток. Такие дендритные клетки, взаимодействуя с Т-лимфоцитами, активируют их, последние становятся Т-хелперными клетками (Th-клетками). Th-клетки помогают дендритным клеткам более эффективно активировать наивные CD8⁺ Т-клетки, вызывая образование цитотоксических Т-лимфоцитов и стимулируя В-клетки к образованию специфических антител [2].

Очевидно, искусственный мозаичный белок, претендующий на роль вакцинного препарата, должен включать Т- и В-эпитопные пептиды и прилегающие к их концам 2–8 аминокислотных остатков, выполняющих роль участков, чувствительных к протеолизу в дендритных клетках. Их наличие существенно для образования иммуногенных пептидов [3]. Для улучшения иммунного ответа такой белок должен содержать также Th-эпитопы и адъювантные компоненты, что усиливает его иммуногенность.

Источником иммуногенных пептидов в настоящем исследовании были антигены вируса гепатита С (ВГС) NS4A и NS4B. Неструктурный полипептид NS4A, частично погружённый

в мембрану эндоплазматической сети, выполняет функцию кофактора сериновой протеазы NS3, участвующей в нарезании вирусного полипротеина на отдельные вирусные белки. Он, как и протеаза NS3, играет ключевую роль в репродукции вируса. Анализ иммунореактивных свойств пептидов, синтезированных на основе аминокислотной последовательности NS4A, показал, что С-концевая часть молекулы содержит генотипспецифичные последовательности, что свидетельствует о вариативности ряда аминокислотных позиций [4]. Остальные части молекулы NS4A – N-концевая, погружённая в мембрану, и срединная, контактирующая с сериновой протеазой, – представлены более консервативными последовательностями. В срединной части (аминокислотные позиции 21–32) молекулы NS4A возможны аминокислотные замены, которые влияют на активность сериновой протеазы, особенно если они локализованы в позициях 30–32 [5]. Установлено, что интенсивный гуморальный ответ на NS4A перед началом комбинированной интерферонотерапии ассоциирован с достижением устойчивого вирусологического ответа [6, 7]. Комплекс NS3/4A обладает способностью расщеплять клеточные сигнальные белки MAVS и TRIF, влияющие на продукцию интерферонов I типа, снижая, таким образом, эффективность защиты системы врожденного иммунитета [8, 9].

Другим белком, иммуногенные фрагменты которого были использованы для конструирования рекомбинантного мозаичного белка, является NS4B. В структуре этого белка выделяют 4 трансмембранных участка и экспонированные зоны. Основная функция NS4B – создание платформы (web), на которой происходит сборка репликативного комплекса ВГС. Экспериментально показано, что данный белок взаимодействует с клеточным адапторным белком STING, что приводит к остановке интерферонового звена защиты инфицированной клетки; может вызывать её трансформацию и, вероятно, вовлечен в развитие фиброза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [10, 11].

Ранее в белке NS4B выявлены и локализованы В-клеточные, Т-киллерные и Т-хелперные эпитопы [12–14].

На основании изложенных сведений и информации баз данных были сконструированы 4 рекомбинантных мозаичных белка, содержащих Т- и В-эпитопы антигенов NS4A и NS4B, и компоненты, усиливающие их иммуногенность: мышинный IL-2, Th-эпитоп из нуклеокапсидного (core) белка и липопептид *Neisseria meningitidis* [15–21].

Цель данного исследования – изучить иммуногенные свойства рекомбинантных мозаичных белков, сконструированных на основе эпитопов антигенов NS4A и NS4B, слитых с адьювантными компонентами в единый белок.

Материал и методы

Бактерии и плазмиды. Для клонирования были использованы бактерии *E. coli* DLT1270 и *E. coli* DH5a. Для экспрессии использовали *E. coli* DLT1270, трансформированные плазмидой pQE30, содержащей последовательность целевого белка. Плазмида pQE30 была модифицирована вставкой глицинового шарнира по сайтам BamH1-SacI (pQE30mod) для улучшения взаимодействия гексагистидинового участка с Ni-сорбентом при очистке. Нуклеотидные последовательности, оптимизированные для *E. coli*, кодирующие рекомбинантные белки NS4a-IL2 и IL-2 (мышинный интерлейкин-2) были синтезированы («Евроген», РФ) и лигированы в плазмиду pQE30mod по сайтам рестрикции SacI и KpnI. Синтетическая нуклеотидная последовательность LTNb («Евроген», РФ) была лигирована в pQE30mod по SacI и Hinc2. В работе использовали ферменты и буферные системы от «СибЭнзим» (РФ) и «Fermentas» (Латвия).

Аминокислотная последовательность рекомбинантного мозаичного белка на основе NS4B (субтипа 1b), названного LTNb (от liporeptide-Th-epitope-NS4b), соответствовала: MRGS (стартовый участок) – HHHHHH (гистидиновый tag) – GSGTSGSSGSGSGGGSGGGG (глициновый линкер) – EL (сайт рестрикции SacI) – MKKLLIAAMMAAALAACS QEAKQEVREAVQAVESDVKDTA (липопептид) – VD (сайт рестрикции SalI) – KLGKGGK (глицин-лизиновый линкер) – FPGGGQIVGGVYLLPRRGPRL (Th-эпитоп из core) – KK (лизиновый линкер) – HM (сайт рестрикции NdeI) – WNFISG (Т-эпитоп из NS4B) – VQYLAGL[STLPGNPAI]ASL (Th-эпитоп + В-эпитоп из NS4B) – MAFTA[SITSPLTT] (Т-эпитоп из NS4B + В-эпитоп) – QYTLLFNILGGWV (Т-эпитоп из NS4B) – KK (лизиновый линкер) – ILAGYAGV (Т-эпитоп из NS4B) – KK (лизиновый линкер) – VDLAEAAAKEAAAK EAAAKEAAAKEAAAKAAADI (альфа-спиральный линкер). В квадратных скобках – В-эпитопы NS4B [21]. Спиральный линкер использовали для разделения функциональных доменов в рекомбинантных белках [22]. При конструировании белка, содержащего эпитопы NS4A и NS4B, он располагался между эпитопами этих антигенов. Для усиления иммуногенности к N-концу был присоединён липидируемый пептид (липопептид), как описано Н.-W. Chen и соавт. [23]. В нуклеотидной последовательности LTNb были вставлены сайты рестрикции SalI и NdeI, позволявшие удалять нуклеотидные последовательности, соответствующие липопептиду или Th-эпитопу, и получать новые рекомбинантные белки LNb (без Th-эпитопа) и TNb (без липопептида).

Индукция рекомбинантных белков. Ночную культуру выращивали в бульоне 2ТУ с ампициллином 100 мкг/мл (1/100 объёма). Индукцию проводили в бульоне 2ТУ с ампициллином (50 мкг/мл) и изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) (0,5 мМ) в течение ночи при 28°C.

Очистка рекомбинантных белков на Ni-сорбенте. Растворимые белки удаляли после обработки клеток лизоцимом. Рекомбинантные белки оставались в осадке, к которому добавляли 1 мл 7 М гуанидин гидрохлорида в 10 мМ фосфатно-трисовом буфере (рН 8,0) с 20 мМ имидазолом и 0,5 М хлористым натрием, обрабатывали ультразвуком и выдерживали

при комнатной температуре 20 мин. Центрифугировали 10 мин при 13 тыс. об/мин. Полученный супернатант добавляли к Ni-сорбенту («Promega», США). Сорбцию проводили на шейкере (60 мин, температура комнатная). Промывку выполняли 7 М гуанидин гидрохлоридом с 40 мМ имидазолом (1 мл, 3 раза), затем 9 М мочевиной в том же буфере с 40 мМ имидазолом (1 мл, 3 раза). Снятие рекомбинантных белков осуществляли 1 М имидазолом в том же буфере с 4,5 М мочевиной.

Белковый анализ. Концентрацию белка определяли стандартным методом Бредфорд. Электрофоретический анализ белков выполняли общепринятым методом Лэммли в 10% полиакриламидном геле с 0,1% додецилсульфатом натрия.

Атомно-силовую микроскопию (АСМ) проводили на приборе Ntegra («NT-MDT», РФ).

Дендритные клетки из лимфоцитов селезёнки, костного мозга, тимуса и лимфоузлов мышей (Balb/c, масса 18–20 г) получали и активировали по методикам, описанным ранее [24, 25]. После активации рекомбинантными белками (в течение 24–48 ч) дендритные клетки добавляли к сингенным лимфоцитам в соотношении 1:10. Оценку продукции гамма-интерферона выполняли с помощью ELISpot («R&D Systems», США), регистрацию результатов осуществляли, используя прибор AID EliSpot Reader («Autoimmun Diagnostika GmbH», Германия).

Иммуноферментный анализ и иммуноблоттинг проводили по стандартным методикам. Сэндвич-ИФА использовали для устранения влияния антител к гистидиновой последовательности (оставшейся во всех рекомбинантных белках, кроме IL-2) на анализ сывороток иммунизированных мышей. В качестве первого слоя использовали моноклональные антитела Pentahis antibody («Qiagen», Германия) в количестве 0,6 мкг на лунку. После закрытия свободных зон 1% бычьим сывороточным альбумином в фосфатно-солевом буфере (рН 7,3; 1 ч; 37°C) сорбировали рекомбинантные антигены, а затем после промывки вносили сыворотку иммунизированных мышей. Далее следовали стандартные этапы. При анализе взаимодействия мышинных антител с отдельными вирусными белками с помощью коммерческой тест-системы «Бест анти-ВГС-спектр» («Вектор-Бест», РФ) использовали антимышинный конъюгат («Имтек», РФ). Коэффициент позитивности рассчитывали как отношение оптической плотности образца к критической оптической плотности, величина которой в 3 раза превышала среднюю оптическую плотность 10 отрицательных образцов.

Для иммунизации использовали линейных мышей Balb/c массой 18–20 г (возраст 6–8 нед). Иммунизировали каждым препаратом (5 мышей) в дозе 50 мкг на мышь, двукратно с интервалом 4 нед, подкожно в области передней части спины. Кровь брали на 7-й день после второй иммунизации. Животных забивали путем декапитации под наркозом (смесь эфира с хлороформом в соотношении 1:1) с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, и в соответствии с требованиями правил проведения работ с использованием экспериментальных животных.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью пакета программ Statistica 10.0 («Tulsa», США). Различия между сравниваемыми величинами считали достоверными при вероятности более 95% ($p < 0,05$).

Результаты

Индукция LTNb и LNb сопровождалась лизисом бактериальных клеток, что свидетельствует о токсичности продуктов экспрессии для клеток *E. coli*. Для устранения этого эффекта была заменена питательная среда LB на более богатую среду 2ТУ, понижена концентрация ИПТГ и изменены условия экспрессии (см. «Материал и методы»). При этих условиях экспрессия и выход очищенного белка LTNb повысились. Из 50 мг сырой массы индуцированных клеток в среде 2ТУ получали почти 200 мкг гомогенного белка.

Таблица 1

Результаты анализа сывороток мышей, иммунизированных очищенными препаратами рекомбинантных мозаичных белков и GFP с гистидиновой последовательностью (GFP-his)

Антиген	Сыворотки к LTNb	Сыворотки к LNb	Сыворотки к TNb
LTNb	1:1380	1:612	1:646
LNb	1:603	1:398	1:263
TNb	1:794	1:263	1:692
GFP-his	1:214	Нет реакции	Нет реакции

Примечание. Данные представлены как среднегеометрическое значение титров сывороток. GFP – зелёный флуоресцирующий белок.

Очищенным рекомбинантным белком LTNb иммунизировали мышей. На рис. 1 (см. 3-ю полосу обложки) представлены данные иммуноблоттинга препарата LTNb с сывороткой иммунизированной мыши (рис. 1, а) и больного хроническим гепатитом С (рис. 1, б).

Как следует из рисунка, сыворотка иммунизированной мыши и больного реагировала с рекомбинантным белком LTNb. Реакция сыворотки больного хроническим гепатитом С с препаратом LTNb показала, что В-эпитопы рекомбинантного белка распознаются антителами пациента, сформированными на естественный антиген NS4В.

Для анализа вклада в иммуногенность отдельных компонентов рекомбинантного белка LTNb были получены производные от LTNb: белки LNb (без Th-эпитопа соге-белка ВГС) и TNb (без липопептида). На эти препараты были получены мышинные сыворотки, которые анализировали с помощью иммуноферментного анализа (табл. 1).

Самый интенсивный В-клеточный ответ сформировался на препарат LTNb, в конструкции которого присутствовали липопептид и Th-эпитоп из соге-белка ВГС. Иммунизированные им мыши имели антитела к LNb (без Th-эпитопа), TNb (без липопептида) и в низком содержании – к GFP, соединённому с гексагистидиновой последовательностью. Антитела к GFP-his в двух других группах мышей отсутствовали. У всех мышей отсутствовали также антитела к липидируемому пептиду из *Neisseria meningitidis* и GFP (данные не приводятся). Оценивая сыворотки мышей, иммунизированных препаратами LNb и TNb, можно отметить близость их показателей (вероятность различия $p > 0,05$). Анализируя сыворотки иммунизированных мышей в тест-системе «Бест анти-ВГС-спектр», обнаружили, что мыши, иммунизированные препаратами LTNb и TNb, имели антитела к NS4AB и соге-белку. Наличие антител к соге-белку было вызвано тем, что аминокислотная последовательность этого Th-эпитопа перекрывается с В-эпитопом, что не отметили Х.Х. Huang и соавт. [13].

Следующим этапом настоящего исследования было соединение последовательностей, кодирующих NS4A-IL2 с LTNb.

Таблица 2

Гуморальный ответ мышей, иммунизированных рекомбинантными белками, по данным сэндвич-метода ИФА

Антигены	Сыворотка на препарат LTNb-NS4a-IL2	Сыворотка на препарат LTNb	Сыворотка на препарат NS4a-IL2
GFP-his	Отр.	Отр.	Отр.
IL-2	2,427*	Отр.	3,321
LTNb	6,987	9,512	Отр.
LTNb-NS4a-IL-2	24,106	4,458	4,108
NS4a-IL-2	1,089	Отр.	5,217

Примечание. Отр. – отрицательный результат; * – коэффициент позитивности.

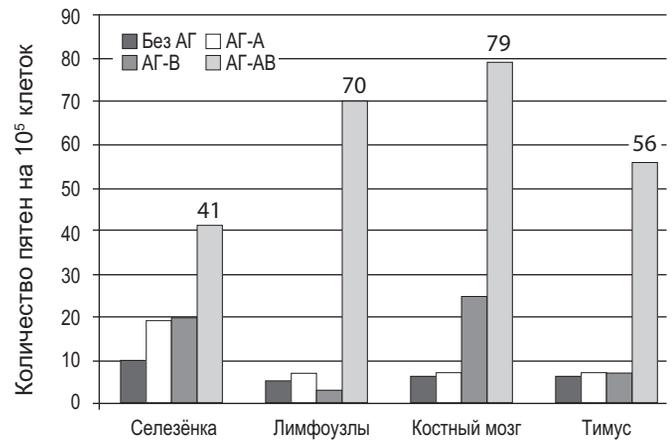


Рис. 3. Продукция гамма-интерферона Т-лимфоцитами при стимуляции дендритных клеток антигенами NS4a-IL2 (АГ-А); LTNb (АГ-В); LTNb-NS4a-IL2 (АГ-АВ).

Ранее, изучая варианты рекомбинантных белков на основе NS4A, было показано, что для наибольшей эффективности при иммунизации следует использовать полноразмерный белок (54 аминокислотных остатка) [26]. В объединённой конструкции LTNb-NS4a-IL2 адьювантные части локализовались на разных концах молекулы: липопептид – на N-конце, IL-2 – на С-конце.

Индукцированный белок LTNb-NS4a-IL2 находится в осадке лизата бактериальных клеток. Все этапы растворения и очистки проводили с использованием детергентов и хаотропных агентов (см. «Материал и методы»). Очищенный рекомбинантный белок LTNb-NS4a-IL2 имел молекулярную массу около 37 кДа по данным электрофоретического анализа (рис. 2, см. 3-ю полосу обложки).

Как отмечено выше (см. табл. 1), у некоторых мышей были обнаружены антитела к гексагистидиновой последовательности. Чтобы устранить влияние этих антител на оценку иммуногенности рекомбинантных белков, был использован сэндвич-метод ИФА с моноклональными антителами к гистидиновой последовательности (табл. 2).

Этот анализ позволил установить, что рекомбинантные белки, содержащие IL-2, у некоторых мышей индуцируют образование антител к данному цитокину. Препарат LTNb-NS4a-IL2 вызывает образование антител к NS4A, так и к NS4B, при этом образование антител ко второму белку больше, чем к первому (1,089 против 6,987; $p < 0,03$). Сравнивая коэффициент позитивности для сывороток против препаратов, на которые они были получены, можно отметить, что иммуногенность и коэффициент позитивности заметно возрастает в ряду NS4a-IL2 (5,217) – LTNb (9,512) – LTNb-NS4a-IL2 (24,106). Последний препарат эффективнее LTNb и NS4a-IL2 ($p < 0,02$). Коэффициент позитивности белка LTNb-NS4a-IL2 превышает сумму составляющих его частей, что свидетельствует о синергизме действия адьювантов.

Индукцию Т-клеточного ответа анализировали по продукции гамма-интерферона лимфоцитами, смешанными с дендритными клетками после инкубации последних с препаратами рекомбинантных белков (см. «Материал и методы»). Результаты анализа в ELISpot продукции этого цитокина лимфоцитами из разных органов при активации различными препаратами представлены на рис. 3.

Наибольшая продукция гамма-интерферона наблюдалась при активации дендритных клеток препаратом LTNb-NS4a-IL2. В усиление продукции анализируемого цитокина под действием этого препарата, очевидно, внес вклад синергизм действия двух адьювантных компонентов. При стимуляции дендритных клеток препаратом LTNb-NS4a-IL2 самый высо-

кий уровень продукции гамма-интерферона был выявлен у лимфоцитов из костного мозга и лимфоузлов по сравнению с лимфоцитами из селезенки и тимуса ($p < 0,01$).

Учитывая влияние размера белковых комплексов на их иммуногенность [27], изучали аналогичные параметры полученных рекомбинантных белков методом АСМ (рис. 4, см. 3-ю полосу обложки).

Ранее с помощью метода АСМ мы показали, что препарат NS4a-IL2 образует наночастицы размером 6–8 нм [26]. В настоящем исследовании в препарате LTNb выявлялись наночастицы размером 30–50 нм, а в препарате LTNb-NS4a-IL2 – до 100–120 нм.

Обсуждение

Конструирование и анализ свойств рекомбинантных мозаичных белков являются сложной задачей, поскольку свойство и конформация отдельных компонентов в искусственном протеине могут изменяться из-за их взаимного влияния друг на друга и нарушения доступности зон, расщепляемых протеазами в дендритных клетках. Недавно сконструирован мультиэпитопный мозаичный рекомбинантный белок для выявления антител к разным антигенам ВГС [28].

В наши конструкции, основанные на вирусных антигенах NS4A и NS4B, были включены пептидные последовательности, соответствующие Т-цитотоксическим, Т-хелперным и В-клеточным эпитопам, усиленные адьювантными компонентами нескольких видов с учётом разработок, обеспечивающих правильный процессинг и презентацию пептидов дендритными клетками [8, 12]. Ранее нами было показано, что рекомбинантный полноразмерный NS4A обладает более высокой иммуногенностью, если он соединен с мышинным IL-2 [26]. Однако в новом рекомбинантном мозаичном белке LTNb-NS4a-IL2, содержащем Т- и В-эпитопы белка NS4B и полную аминокислотную последовательность NS4A, гуморальный ответ на NS4A, слитый с IL-2, оказался более слабым, чем в препарате NS4a-IL2 [26]. Очевидно, в структуре нового рекомбинантного белка LTNb-NS4a-IL2 В-эпитопы NS4A были менее доступными для презентации в дендритных клетках, чем эпитоп NS4B.

В рекомбинантном белке LTNb-NS4a-IL2 содержались Т-цитотоксические и Th-эпитопы NS4B, охарактеризованные другими авторами [12–14, 29, 30]. Х.Х. Huang и соавт. [13] для стимуляции CD4+ и CD8+ Т-клеточного ответа поместили Th-эпитоп из core-белка ВГС (KFPGGGQIVGGVYLLPRRG-PRL) между двумя цитотоксическими эпитопами. Авторы показали эффективность этой конструкции в индукции клеточного иммунного ответа по сравнению с рекомбинантным белком без этого Th-эпитопа. Однако они не отметили, что Th-эпитоп из core-белка перекрывается с В-клеточным эпитопом, что было обнаружено в нашем исследовании. Анализ гуморального ответа на компоненты конструкции LTNb-NS4a-IL2 показал более высокую эффективность в индукции В-клеточного ответа эпитопов NS4B, чем NS4A, что может быть связано с большей доступностью для протеаз дендритных клеток В-эпитопа из NS4B.

Т-клеточный ответ на препараты оценивали по индукции выработки гамма-интерферона. Этот интерферон, продуцируемый Т-лимфоцитами, является ключевым цитокином, его продукция служит индикатором формирования иммунного ответа по Th1-типу, с недостаточной эффективностью которого связывают развитие хронического гепатита С. Наличие продукции гамма-интерферона является хорошим показателем формирования Т-клеточного ответа под действием рекомбинантных белков (см. рис. 3). Максимальный ответ наблюдался при стимуляции препаратом LTNb-NS4a-IL2, особенно в лимфоцитах костного мозга и лимфоузлов, что также говорит об эффективной стимуляции как В-клеточного, так и Т-клеточного ответа.

Как отмечено ранее М.Ф. Bachmann и Г.Т. Jennings [27], наиболее эффективными иммуногенами являются белковые

частицы, имеющие размер 50–100 нм. Исследование препаратов наших рекомбинантных белков с помощью АСМ показало увеличение размеров образующихся белковых частиц от 6–8 нм для NS4a-IL2 [26] до 30–50 нм для LTNb и 100–120 нм для LTNb-NS4a-IL2. Вероятно, можно говорить о вкладе в иммуногенность препарата LTNb-NS4a-IL2, связанном с размером белковых частиц.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что сконструированный финальный рекомбинантный белок LTNb-NS4a-IL2 высокоиммуногенен, и адьювантные компоненты IL-2 и липопептид действуют синергично, взаимно усиливая иммуногенность препарата, и эффективно стимулируют В- и Т-клеточный иммунный ответ.

Выводы

1. Из четырех исследованных конструкций наибольшая иммуногенность была обнаружена у препарата LTNb-NS4a-IL2, содержащего Т- и В-эпитопы NS4B, полноразмерный NS4A, липопептид *Neisseria meningitidis* и мышинный IL-2.

2. При иммунизации мышей рекомбинантным мозаичным белком LTNb-NS4a-IL2 обнаружена преимущественная выработка антител к В-эпитопам NS4B, уровень антител к NS4A был заметно ниже.

3. Наблюдали синергизм иммуностимулирующего действия адьювантных компонентов липопептида *Neisseria meningitidis* и мышинного IL-2, когда они располагались на N- и C-концах рекомбинантного белка.

4. Учитывая эффективный Т- и В-клеточный ответ, рекомбинантный мозаичный белок LTNb-NS4a-IL2 можно рассматривать как конструкционный прототип для разработки вакцинного препарата против гепатита С.

Финансирование. Исследование поддержано грантом РФФИ №16-04-00450.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-6, 8-25, 27–30 см. REFERENCES)

- Николаева Л.И., Макашова В.В., Петрова Е.В., Шипулин Г.А., Самохвалов Е.И., Токмалаев А.К. и др. Снижение содержания антител к вирусу гепатита С при антивирусной терапии. *Биомедицинская химия*. 2009; 55(2): 201-12.
- Куприянов В.В., Николаева Л.И., Зыкова А.А., Махновский П.И. Изучение перспектив использования антигена NS4A вируса гепатита С для разработки мозаичной рекомбинантной вакцины с самоадьювантными свойствами. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16(1): 61-7.

REFERENCES

- <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01436357>
- Ridge J.P., Di Rosa F., Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature*. 1998; 393(6684): 474-8.
- Jallow S., Leligdowicz A., Kramer H.B., Onyango C., Cotton M., Wright C., et al. The presence of prolines in the flanking region of an immunodominant HIV-2 gag epitope influences the quality and quantity of the epitope generated. *Eur. J. Immunol.* 2015; 45(8): 2232-42.
- Chang J.C., Seidel C., Ofenloch B., Jue D.L., Fieds H.A., Khudyakov Y.E. Antigenic heterogeneity of the hepatitis C virus NS4 protein as modeled with synthetic peptides. *Virology*. 1999; 257(1): 177-90.
- Bermúdez-Aguirre A.D., Padilla-Noriega I., Zenteno E., Reyes-Leyva J. Identification of amino acid variants in the hepatitis C virus non-structural protein 4A. *Tohoku J. Exp. Med.* 2009; 218(3): 165-75.
- Desombere I., Van Vlierberghe H., Wieland O., Hultgren C., Sallberg M., Quiroga J., et al. Serum levels of anti-NS4a and anti-NS5a predict treatment response of patients with chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.* 2007; 79(6): 701-13.
- Nikolaeva L.I., Makashova V.V., Petrova E.V., Shipulin G.A., Samokhvalov E.I., Tokmalaev A.K., et al. The decline in antibodies to hepatitis C virus during antiviral therapy. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2009; 55(2): 201-12. (in Russian)
- Li X.D., Sun L., Seth R.B., Pineda G., Chen Z.J. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the

- mitochondria to evade innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102(49): 17717-22.
9. Li K., Foy E., Ferreon J.C., Nakamura M., Ferreon A.C., Ikeda M., et al. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102(8): 2992-7.
 10. Nitta S., Sakamoto N., Nakagawa M., Kakinuma S., Mishima K., Kusano-Kitazume A., et al. Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology*. 2013; 57(1): 46-58.
 11. Einav S., Sklan E.H., Moon H.M., Gehrig E., Liu P., Hao Y., et al. The nucleotide binding motif of hepatitis C virus NS4B can mediate cellular transformation and tumor formation without Ha-ras co-transfection. *Hepatology*. 2008; 47(3): 827-35.
 12. Duan L., Lei P., Yumei X., Xiaoping X., Futao Z., Li M., et al. Prediction and identification-based prediction of chinese hepatitis C viral-specific cytotoxic T lymphocyte epitopes. *J. Med. Virol.* 2011; 83(8): 1315-20.
 13. Huang X.J., Lü X., Lei Y.F., Yang J., Yao M., Lan H.Y., et al. Cellular immunogenicity of a multi-epitope peptide vaccine candidate based on hepatitis C virus NS5A, NS4B and core proteins in HHD-2 mice. *J. Virol. Meth.* 2013; 189(1): 47-52.
 14. Day C.L., Lauer G.M., Robbins G.K., McGovern B., Wurcel A.G., Gandhi R.T., et al. Broad specificity of virus-specific CD4 T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 2002; 76(24): 12584-95.
 15. Alexander J., Oseroff C., Dahlberg C., Qin M., Ishioka G., Beebe M. A Decapeptide polypeptide primes for multiple CD8+, IFN-gamma and Th lymphocyte responses: evaluation of multipeptide polypeptides as a mode for vaccine delivery. *J. Immunol.* 2002; 168(12): 6189-98.
 16. Chua B.Y., Eriksson E.M., Brown L.E., Zeng W., Gowans E.J., Torresi J., et al. A self-adjuncting lipopeptide-based vaccine candidate for the treatment of hepatitis C virus infection. *Vaccine*. 2008; 26(37): 4866-75.
 17. Langhans B., Braunschweiler I., Schweitzer S., Jung G., Inchauspé G., Sauerbruch T., et al. Lipidation of T helper sequences from hepatitis C virus core significantly enhances T-cell activity *in vitro*. *Immunology*. 2001; 102(4): 460-5.
 18. Shamriz S., Ofoghi H. Design, structure prediction and molecular dynamics simulation of a fusion construct containing malaria pre-erythrocytic vaccine candidate, PfcElTOS, and human interleukin 2 as adjuvant. *BMC Bioinformatics*. 2016; 17: 71-86.
 19. Faulkner L., Buchan G., Lockhart E., Slobbe L., Wilson M., Baird M. IL-2 linked to a peptide from influenza hemagglutinin enhances T cell activation by affecting the antigen-presentation function of bone marrow-derived dendritic cells. *Int. Immunol.* 2001; 13(6): 713-21.
 20. Zhang H.X., Qiu Y.Y., Zhao Y.H., Liu X.T., Liu M., Yu A.-L. Immunogenicity of oral vaccination with *Lactococcus lactis* derived vaccine candidate antigen (UreB) of *Helicobacter pylori* fused with the human interleukin 2 as adjuvant. *Mol. Cell Probes*. 2014; 28(1): 25-30.
 21. Peptide Cleavage. Available at: <http://peptibase.cs.biu.ac.il/PepCleavage/II/SYFPEITHI>. Available at: <http://www.syfpeithi.de> MAPPP. Available at: <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP> Immune epitope database and analysis resource. Available at: <http://www.iedb.org>
 22. Arai R., Wriggers W., Nishikawa Y., Nagamune T.I., Fujisawa T. Conformations of variably linked chimeric proteins evaluated by synchrotron X-ray small-angle scattering. *Proteins*. 2004; 57(4): 829-38.
 23. Chen H.W., Liu S.J., Liu H.H., Kwok Y., Lin C.L., Lin L.H., et al. A novel technology for the production of a heterologous lipoprotein immunogen in high yield has implications for the field of vaccine design. *Vaccine*. 2009; 27(9): 1400-9.
 24. Lu L., Hsieh M., Oriss T.B., Morel P.A., Starzl T.E., Rao A.S., et al. Generation of DC from mouse spleen cell cultures in response to GM-CSF: immunophenotypic and functional analyses. *Immunology*. 1995; 84(1): 127-34.
 25. Muccioli M., Pate M., Omosebi O., Benencia F. Generation and labeling of murine bone marrow-derived dendritic cells with Qdot nanocrystals for tracking studies. *J. Vis. Exp.* 2011; (52): e2785.
 26. Kupriyanov V.V., Nikolaeva L.I., Zykova A.A., Makhnovskiy P.I. Study the prospects for using the hepatitis C virus antigen NS4A to develop a mosaic recombinant vaccine with self-adjuncting properties. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2017; 16(1): 61-7. (in Russian)
 27. Bachmann M.F., Jennings G.T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10(6): 787-96.
 28. Galdino A.S., Santos J.C., Souza M.Q., Nóbrega Y.K.M., Xavier M.A.E., Felipe M.S.S., et al. A novel structurally stable multipeptide protein for detection of HCV. *Hepat. Res. Treat.* 2016; 2016: 6592143.
 29. Chang K.M., Rehmann B., McHutchison J.G., Pasquinelli C., Southwood S., Sette A., et al. Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the hepatitis C virus. *J. Clin. Invest.* 1997; 100(9): 2376-85.
 30. Gerlach J.T., Ulsenheimer A., Gruner N.H., Jung M.C., Schraut W., Schirren C.A., et al. Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4+ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. *J. Virol.* 2005; 79: 12425-33.

Поступила 10.11.17
Принята в печать 12.12.17

РЕЦЕНЗИИ

© АЛЕКСЕЕВА С.В., 2018
УДК 616.993/995(049.32)

Макаров В.В., Лозовой Д.А. Новые особо опасные инфекции, ассоциированные с рукокрылыми. Владимир: РУДН, ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2016. — 160 с.

Монография представляет собой редкий для отечественной научной литературы аналитический труд по проблеме вирусных зоонозов, ассоциированных с рукокрылыми, что особенно важно в связи с эмерджентной природой данных инфекций. Авторами проведено глубокое всестороннее изучение фундаментальных основ новых особо опасных инфекций рукокрылых и их эпидемиологических особенностей. Привлечено внимание к малоизученности инфекций, связанных с рукокрылыми, в отечественной эпидемиологии, особенно ветеринарной, хотя несомненным является факт серьёзной глобальной эпидемиологической опасности системы вирус—рукокрылые. В качестве наиболее актуального примера можно привести бешенство рукокрылых, являющееся потенциальным риском для людей практически на всех континентах. Недавняя вспышка геморрагической лихорадки Эбола в странах Западной Африки, объявленная ВОЗ угрозой международного масштаба, всколыхнула также интерес к природно-очаговым инфекциям, связанным с рукокрылыми, и вовлечению других восприимчивых видов в эпидемический процесс. Актуальность исследуемого авторами вопроса подтверж-

дается ростом количества научных работ и публикаций по данной проблематике в мире.

Для лучшего раскрытия темы авторами в начале монографии большое внимание уделено рассмотрению систематики, биологии и экологии рукокрылых. Собранный материал чрезвычайно полезен для специалистов, так как позволяет ознакомиться с уникальными биоэкологическими особенностями отряда рукокрылых и связанных с ними причин возникновения особой резервуарной роли этих млекопитающих в эпидемическом процессе. Несоразмерно малый интерес у ветеринарных и медицинских эпидемиологов к рукокрылым, а они являются вторым по численности отрядом млекопитающих после грызунов, связан с необычайной обособленностью существования этих животных, отсутствием информации в учебной и научной специальной литературе. Представленная монография успешно решает задачу по привлечению внимания соответствующих специалистов и создаёт основу для дальнейшего прикладного применения знаний хироптологов (биологов, изучающих рукокрылых) в ветеринарной и медицинской эпидемиологии.

Важное сугубо эпидемиологическое значение имеет

К статье В.В. Куприянова с соавт.

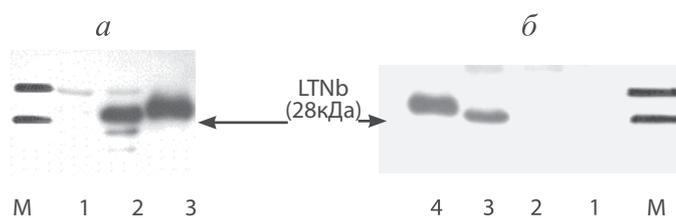


Рис. 1. Иммуноблоттинг очищенного LTNb с сыворотками (разведение 1:2000): мышиной (а) и больного гепатитом (б).

М - маркеры масс (25 и 35 кДа); а: 1 - клетки без индукции; 2 - клетки с индукцией LTNb; 3 - очищенный LTNb; б: 1 - клетки с индукцией NS4a; 2 - клетки без индукции; 3 - клетки с индукцией LTNb; 4 - очищенный LTNb.

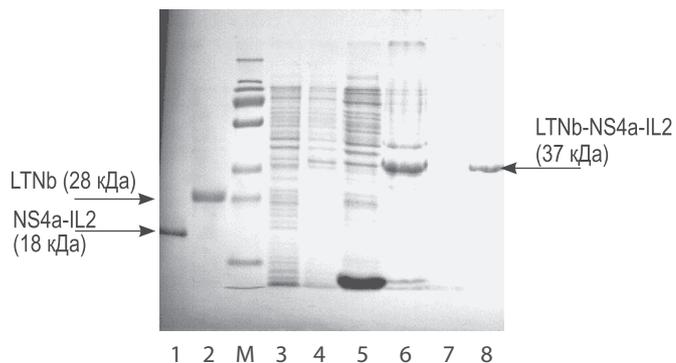


Рис. 2. Электрофоретический анализ рекомбинантных белков.

1 - очищенный NS4a-IL2; 2 - очищенный LTNb; М - маркеры масс (10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130, 250 кДа); 3 - клетки *E. coli* до индукции; 4 - клетки *E. coli* после индукции LTNb-NS4a-IL2; 5 - лизат клеток *E. coli* с индукции LTNb-NS4a-IL2; 6 - осадок клеток *E. coli* с индукции LTNb-NS4a-IL2; 7 - белки, очищенные из лизата на Ni-сорбенте; 8 - белки, очищенные из осадка в 7 М гуанидин гидрохлориде на Ni-сорбенте.

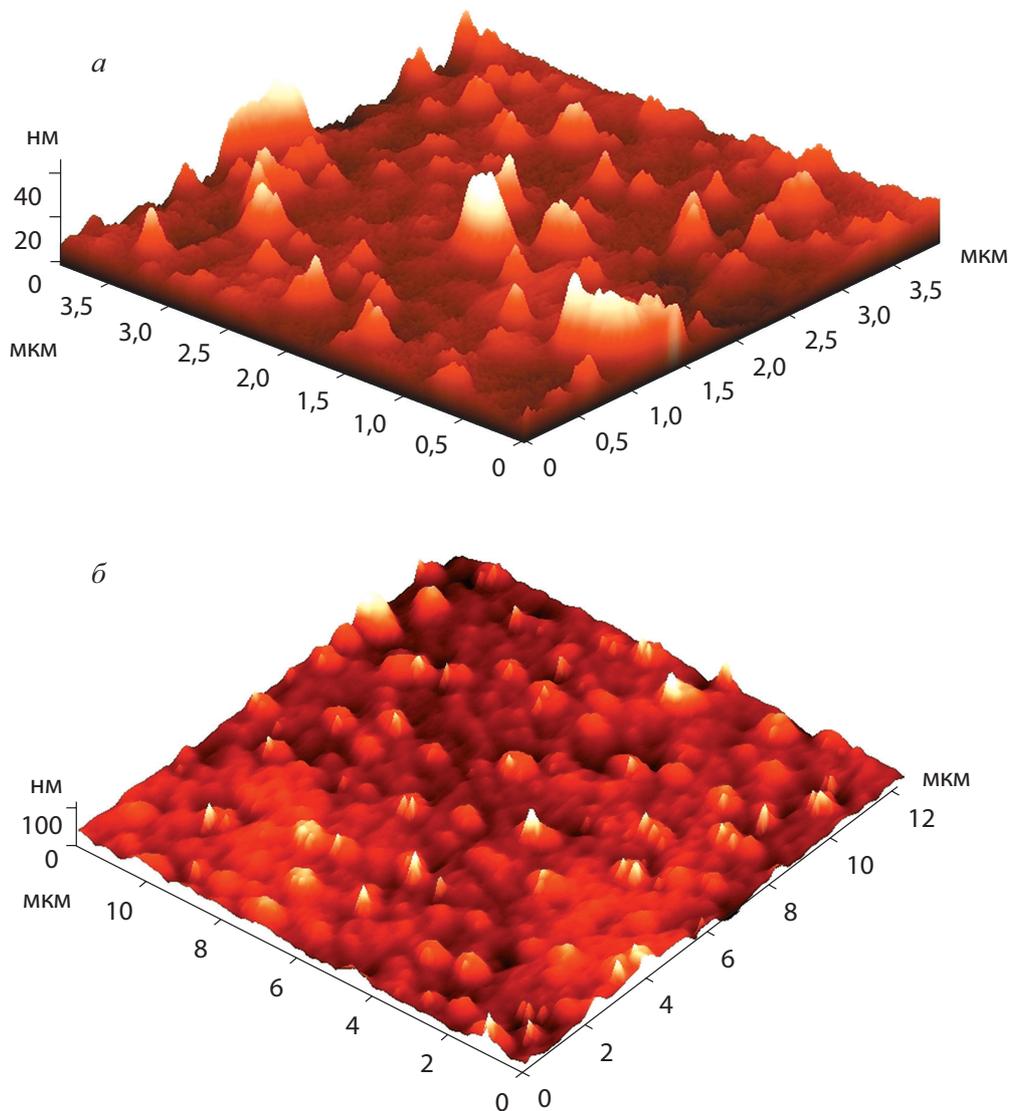


Рис. 4. Объёмное изображение наночастиц препаратов LTNb (а) и LTNb-NS4a-IL2 (б) по данным АСМ.