

УДК 602.6:57.083

Влияние порядка присоединения фрагментов HA2 и M2e вирусов гриппа А к флагеллину на свойства рекомбинантных белков

Л. А. Степанова^{1*}, Р. Ю. Котляров², М. А. Шуклина¹, Е. А. Блохина², М. В. Сергеева¹,
М. В. Потапчук¹, А. А. Ковалева¹, Н. В. Равин², Л. М. Цыбалова¹

¹Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 15/17

²Институт биоинженерии, Исследовательский центр биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

*E-mail: stepanova60@mail.ru

Поступила в редакцию 28.12.2016

Принята к печати 23.01.2018

РЕФЕРАТ Эктодомен белка M2 и консервативные регионы второй субъединицы HA являются перспективными антигенами для создания вакцин с широким протективным потенциалом. На основе флагеллина, четырех копий эктодомена белка M2 вирусов гриппа А и консервативного фрагмента HA2 (76–130) вирусов гриппа филогенетической группы II, содержащего В-клеточные, CD4+ и CD8+ Т-клеточные эпитопы, сконструированы два гибридных рекомбинантных белка с различным порядком присоединения целевых антигенов к С-концу флагеллина. 3D-моделирование структуры двух гибридных белков показало, что внутренняя локализация четырех копий M2e приводила к частичной α -спирализации, нехарактерной для нативной конформации M2e на поверхности вириона. Концевое расположение M2e в большей степени обеспечивало сохранность нативной конформации M2e. Конформационные различия в структуре двух белков влияли на их иммуногенность. Выявлены различия в уровне продукции антител двумя гибридными белками. Белок с концевым положением M2e был более иммуногенным, чем белок с концевым положением участка HA2. Иммунизация гибридным белком с концевым расположением M2e полностью защищала животных от летального заражения. Показано, что порядок расположения целевых антигенов в рекомбинантном белке может влиять на третичную структуру рекомбинантного белка, а также на его иммуногенность и протективный эффект.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вакцина, грипп, HA2, M2e, рекомбинантный белок, флагеллин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ M2e – эктодомен белка M2 вируса гриппа; HA – гемагглютинин; HA2 – вторая субъединица гемагглютинина; Flg – флагеллин; БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж; ИФА – иммуноферментный анализ; ОП – оптическая плотность; СГТ – среднегеометрический титр; ТЦИД₅₀ – 50% тканевая цитопатическая инфекционная доза вируса.

ВВЕДЕНИЕ

Создание вакцин нового поколения, способных обеспечить защиту от широкого спектра вирусов гриппа А, а также от тяжелых форм гриппа А в течение по крайней мере 5 лет, является глобальной задачей. В качестве целевых антигенов при конструировании таких вакцин рассматривают консервативные белки вируса гриппа (M2, HA2, M1, NP). В настоящее время на основе высококонсервативного эктодомена белка M2 (M2e) разработан ряд кандидатных вакцин, показана их иммуногенность и протективность у животных, безопасность и иммуногенность у человека

[1–7]. Вакцины на основе M2e не относятся к профилактическим, они не предотвращают развитие инфекции, однако снижают тяжесть заболевания, ограничивая репликацию вируса, и обеспечивают защиту от вирусов гриппа со сходной последовательностью M2e [8–11]. Защитное действие вакцин на основе M2e зависит от антител [8, 10, 12, 13]. Механизм действия анти-M2e-иммунитета обусловлен антителозависимой клеточной цитотоксичностью и антителозависимым клеточно-обусловленным фагоцитозом. Анти-M2e-антитела в отличие от анти-HA-антител не предотвращают вирусную инфекцию и не явля-

ются нейтрализующими, но могут лизировать инфицированные вирусом гриппа клетки и тем самым ограничивать репликацию вируса [9, 11, 14].

В последнее время пристальное внимание привлекает консервативная в пределах филогенетической группы вторая субъединица HA (HA2), которая отвечает за слияние вирусной и клеточной мембраны в эндосомах, обеспечивая таким образом попадание рибонуклеинового комплекса в цитоплазму [15]. Перекрестно реагирующие моноклональные антитела, которые взаимодействуют с эпитопами, локализованными в стеблевой части HA, могут нейтрализовать вирусы гриппа в пределах филогенетической группы [16–22]. Предприняты попытки поиска наиболее перспективных эпитопов HA2 вирусов гриппа A филогенетических групп I и II (аминокислотные остатки 38–59, 23–185, 1–172, 76–103, 35–107) и конструирования рекомбинантных белков на их основе [23–27]. Исследования на животных показали, что такие белки формируют как гуморальный, так и цитотоксический Т-клеточный ответ, они эффективно защищают от заражения летальными дозами гомологичного и гетерологичного вирусов одной филогенетической группы.

Вакцина на основе консервативных участков нескольких вирусных белков, вызывающих как гуморальный, так и Т-клеточный ответ, и нейтрализующих широкий спектр вирусных штаммов, была бы значительно более эффективной.

В качестве платформы для разработки рекомбинантных вакцин на основе слабо иммуногенных антигенов против вирусных и бактериальных патогенов рассматривается флагеллин [2, 28]. Адьювантный эффект флагеллина обусловлен его способностью связываться с TLR5 на CD11c+ антигенпредставляющих клетках, что объясняет усиление иммуногенности слитых с флагеллином антигенов и способности стимулировать CD4+ Т-зависимый гуморальный ответ [28–31]. Способность флагеллина служить одновременно и платформой, и адьювантом при разработке вакцин показана на различных моделях инфекционных заболеваний, включая грипп [2, 6, 27, 32–34].

В данной работе изучена возможность получения рекомбинантного белка на основе консервативных участков двух вирусных белков (M2 и HA), слитых с С-концом полноразмерного флагеллина. Сконструированы два рекомбинантных белка с различным порядком присоединения к С-концу флагеллина M2e пептидов разных субтипов вирусов гриппа А и консервативного фрагмента второй субъединицы гемагглютинаина вирусов гриппа второй филогенетической группы. Рассмотрено влияние порядка присоединения таргетных антигенов к флагеллину

на структуру, стабильность и иммуногенность рекомбинантных белков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выбор консервативного фрагмента HA2 вирусов гриппа филогенетической группы II

Аминокислотные последовательности HA2 получены из баз данных GenBank и GISAID. Для построения консенсусов последовательности выравнивали с использованием сервера MAFFT и алгоритмов FFT-NS-i, FFT-NS-2 (в зависимости от числа последовательностей) [35] и анализировали в программном пакете Unipro UGENE v.1.14.0 [36]. Выравнивание и анализ небольшого числа последовательностей проводили в программном пакете VectorNTI (Invitrogen, США). Поиск экспериментальных В- и CD4+ Т-клеточных эпитопов, гомологичных участкам HA2, проводили в базе данных Immune Epitope Database [37]. Поиск вероятных Т-клеточных эпитопов осуществляли с использованием NetCTLpan1.1 Server [38] и параметров поиска, установленных по умолчанию. Изображение трехмерной структуры HA получали в программе UCSF Chimera v.1.9 [39] с использованием моделей 4JTV (4O5I (A/Victoria/06/2011(H3N2)), взятых из базы данных RCSB Protein Data Bank. Визуализацию трехмерной структуры белков выполняли в программе Chimera 1.5.3 [39]. Для гомологичного моделирования трехмерной структуры белка по аминокислотной последовательности использовали открытый веб-ресурс Phyre2 [40].

Конструирование экспрессионных векторов

Плазмиду pQE30 (Qiagen) использовали для конструирования векторов, обеспечивающих экспрессию белков с различным порядком присоединения таргетных антигенов. Гибридный белок Flg-4M2e-HA2 содержал флагеллин из *Salmonella typhimurium* (Flg), к С-концу которого были последовательно присоединены четыре копии пептида M2e (две копии консенсусной последовательности M2e вирусов гриппа человека А (M2eh) и две M2e вируса гриппа птиц А/Н5N1 (M2ek)) и консенсусный фрагмент второй субъединицы (76–130) HA вирусов гриппа филогенетической группы II. Во втором гибридном белке (Flg-HA2-4M2e) к флагеллину был сначала присоединен HA2-фрагмент, а затем четыре копии пептида M2e. Химерные гены конструировали с использованием стандартных методов генной инженерии. Ген флагеллина был получен ранее с помощью ПЦР на геномной ДНК *S. typhimurium* и клонирован. Нуклеотидные последовательности, кодирующие консенсусную последовательность HA2 (76–130) вирусов гриппа вто-

рой филогенетической группы и тандемные копии M2e синтезировали *in vitro*. Для экспрессии HA2 в клетках *Escherichia coli* проводили оптимизацию состава кодонов. Таким образом, были созданы векторы pQE30_Flg_HA2_4M2e и pQE30_Flg_4M2e_HA2, обеспечивающие получение соответствующих рекомбинантных белков.

Экспрессия и очистка рекомбинантных белков

С целью получения штаммов, продуцирующих рекомбинантные белки, клетки *E. coli* штамма DLT1270 трансформировали плазмидами pQE30/Flg-HA2-4M2e и pQE30/Flg-4M2e-HA2. Штамм DLT1270, производное DH10B [41], содержит ген репрессора лактозного оперона *lacI*, интегрированный в хромосому. Штаммы-продуценты накапливали в среде LB с ампициллином до середины логарифмической фазы роста ($OP_{600} = 0.4-0.7$) при 37°C, затем добавляли IPTG до конечной концентрации 0.1 мМ и культивировали в течение еще 4 ч при 37°C. Клетки обрабатывали лизоцимом, рекомбинантные белки очищали из клеточного лизата с помощью металл-аффинной хроматографии на Ni-сорбенте.

Электрофорез и вестерн-блот

Электрофорез в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) проводили в денатурирующих условиях по методу Лэммли [42]. Пробы смешивали с буфером для нанесения, содержащим β-меркаптоэтанол, кипятили в течение 7 мин и наносили в градиентный 8–16% ПААГ. Электрофорез проводили в течение 1.5 ч при 10–12 мА. Гель фиксировали 10% уксусной кислотой и окрашивали Кумасси G-250 в течение 18 ч. Горизонтальный перенос белков из ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США) осуществляли в ТВ-буфере (0.03 М глицин, 0.04 М Трис, 0.037% додецилсульфат Na, 20% этанол) с использованием системы Mini Trans-Blot cell (BioRad, США) в охлаждаемой камере при +4°C в течение 1.5 ч при постоянном токе 200 мА. Затем мембрану блокировали в 3% растворе БСА (бычий сывороточный альбумин, Amresco, ЕС) в фосфатно-солевом буфере (ФБР) в течение ночи при комнатной температуре, полосы рекомбинантных белков определяли окрашиванием мембраны мышинными моноклональными анти-M2e-антителами 14C2 (ab5416, Abscam, Великобритания). Мембрану инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с первичными антителами, разведенными в ФБР с 0.1% Твин 20 (ФБРТ) и 3% БСА, затем отмывали в ФБРТ. Белки выявляли окрашиванием мембраны в течение 1 ч при комнатной температуре вторичными антителами (антимышинные IgG козы, Abscam), мечеными пероксидазой хрена и последующей инкубацией в течение 5 мин

с субстратом ТМВ (тетраметилбензидин) Immunoblot solution (Invitrogen, США).

Иммунизация мышей

Мыши Balb/c (самки массой 16–18 г) получены из питомника «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий РАМН. Животных содержали в виварии НИИ гриппа Минздрава России в соответствии с действующими правилами. Мышей иммунизировали рекомбинантными белками Flg-4M2e-HA2 и Flg-HA2-4M2e интраназально (после ингаляционной анестезии 2–3% изофлюрана, 30% O₂, 70% N₂O) трехкратно с интервалом 2 недели в дозе 6 мкг/0.1 мл. Контрольным мышам вводили интраназально 0.1 мл ФБР.

Получение сывороток и бронхоальвеолярных лаважей

Образцы крови и бронхоальвеолярные лаважи (БАЛ) получали от пяти мышей каждой группы через 2 недели после третьей иммунизации, после эвтаназии в CO₂-камере (Vet Tech Solutions, Великобритания). Для получения сыворотки кровь инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C. После образования сгустков крови образцы помещали на поверхность льда и охлаждали в течение 1 ч с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 400 g. Аликвоты сыворотки крови (по 30 мкл) замораживали при температуре -20°C.

Для получения БАЛ труп животного фиксировали на операционном столике брюшком вверх. Кожу разрезали по средней линии от нижней челюсти. В нижнюю часть трахеи в направлении легких вводили катетер на глубину 3–5 мм. Дважды промывали бронхи и легкие 1 мл ФБР. БАЛ центрифугировали в течение 15 мин при 400 g, отбирали аликвоты надосадка и замораживали их при температуре -20°C.

Синтетические пептиды

Иммуногенность рекомбинантных белков оценивали с использованием следующих синтетических пептидов, синтезированных НПО «Верта»:

M2ek SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD (M2e вируса гриппа A/Курган/05/05 (H5N1)),

M2eh SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (консенсусная последовательность M2e вирусов гриппа A человека).

Отличающиеся аминокислотные остатки выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Иммуноферментный анализ

Уровни специфических IgG и IgA у мышей, иммунизированных рекомбинантными белками, определяли в ИФА в 96-луночных планшетах с высокой сорбци-

онной способностью (Greiner, Германия). На планшеты сорбировали M2e-пептиды (5 мкг/мл) или очищенный вирус А/Аичи/2/68 (H3N2) (2 мкг/мл) в ФБР (рН 7.2) в течение ночи при 4°C.

Планшеты блокировали ФБР с 5% ЭТС (300 мкл/лунка) в течение 1 ч при комнатной температуре, затем планшеты отмывали 3 раза ФБР с Твин. В лунки планшетов добавляли по 100 мкл двукратных разведений сывороток или БАЛ в блокирующем буфере, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Использовали поликлональные козы антимышинные IgG и IgA (Abcam), меченные пероксидазой хрена в разведении 1 : 20000. В качестве субстрата использовали ТМБ (BD Bioscience, США), инкубация 15 мин. Оптическую плотность (ОП) измеряли с использованием микропланшетного ридера i-Mark (Bio-Rad) при длине волны 450 нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, при котором оптическая плотность по крайней мере в 2 раза превышает среднее значение бланка.

Вирусы и заражение мышей

В работе использован штамм, полученный из Коллекции вирусов гриппа и ОРЗ лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа НИИ гриппа Минздрава России – А/Аичи/2/68 (H3N2). Для заражения использовали вирус гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2), адаптированный к мышам. Этот штамм получен в НИИ гриппа серией пассажей (мышь/куриный эмбрион) родительского штамма дикого типа. Адаптированный штамм А/Аичи/2/68 (H3N2) сохранял антигенные свойства исходного штамма дикого типа, но приобрел способность летально инфицировать мышей. Аминокислотная последовательность поверхностных белков (M2, NA и HA) этого вируса была такой же, как у вируса гриппа дикого типа [6]. На 14-й день после последней иммунизации мышей Valb/c (по восемь мышей в опытных и контрольной группах) заражали адаптированным к мышам вирусом гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) в дозе 5LD50. Вирус вводили интраназально в объеме 50 мкл/мышь после ингаляционной анестезии (2–3% изофлюрана, 30% O₂, 70% N₂O). После заражения проводили ежедневное наблюдение за животными. Протективное действие рекомбинантных белков оценивали ежедневно по динамике падения массы тела и выживаемости мышей после заражения. В качестве отрицательного контроля в эксперименте по летальному заражению использовали мышей, которым вводили ФБР.

Репродукция вирусов гриппа в легких

Мышей (по три особи в каждой группе) интраназально заражали вирусами гриппа А/Аичи/2/68

(H3N2), А/PR/8/34 (H1N1) и А/Курган/5/05 (H5N1) в дозе 5LD50 через 14 дней после третьей иммунизации. На 6-й день после заражения мышей подвергли эвтаназии (CO₂-камера для эвтаназии, Vet Tech Solutions) и асептически удаляли легкие. Легкие гомогенизировали в 2.7 мл ФБР (Tissue Lyser II homogenizer, Qiagen, США) для получения 10% (w/v) суспензии, центрифугировали в течение 15 мин при 400 g и 4°C для удаления клеточного дебриса и хранили при -20°C. Для определения титра вируса гриппа использовали культуру клеток MDCK в среде MEM, выращенных на 96-луночных панелях. Клетки заражали серийными десятикратными разведениями легочного гомогената (в квадрипликатах) от 10⁻¹ до 10⁻⁸ и инкубировали в термостате (36.0 ± 0.5°C) в течение 72 ч. По окончании срока инкубации культуральную жидкость переносили в лунки планшета для иммунологических реакций, после чего добавляли равный объем 1% куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Уровень репродукции вируса в лунках панели оценивали по реакции гемагглютинации эритроцитов. Инфекционную активность вируса рассчитывали по методу Рида и Менча. За титр вируса принимали величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации, и выражали в логарифмах 50% тканевой цитопатической инфекционной дозы вируса (lg ТЦИД₅₀).

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prizm v6.0. Статистическую значимость различий титров антител оценивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Показатели выживаемости сравнивали с использованием критерия Мантела–Кокса. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ фрагмента HA2 (76–130) вирусов гриппа филогенетической группы II

Фрагмент HA2 (76–130) представляет собой большую α-спираль второй субъединицы HA, частично доступную с поверхности молекулы (рис. 1А). Консенсусные последовательности гемагглютининов вирусов гриппа филогенетической группы II (подтипы H3 и H7) в участке HA2 (76–130) идентичны на 63.6% (рис. 1Б). С учетом замен аминокислотных остатков на близкие по свойствам гомология составляет 80%. Для вирусов гриппа филогенетической группы II В- и CD4+ Т-клеточные эпитопы сосредоточены в первой половине участка – аминокислоты

А

№ эпитопа	80	90	100	110	120	130
	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5
	RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTRRQLRENA					
13575	ENQHTIDLTDSEMKNLFEKTRRQLRENAEDMGNGCF					
22098	GRIQDLEKYVEDTKIDLWS					
30386	KEFSEVEGRIQDLEKYV					
31200	KIDLWSYNAELLVALE					
31201	KIDLWSYNAELLVALENQHTI					
36498	LLEKTNKFKHQTEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKI					
50488	QDLEKYVEDTKIDLWS					
50489	QDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTD					
62654	SYNAELLVALENQHTI					
97636	SEVEGRIQDLEKYVEDTK					
113533	IDLWSYNAELLVAL					
129078	KIDLWSYNAELLVALEN					
129760	RIQDLEKYVEDTKIDLW					
130384	YNAELLVALENQHTIDL					
143423	KIDLWSYNAELLVALENQHT					
422849	WSYNAELLVALENQHTI					

Б

аллель	80	90	100	110	120	130
	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5	0 5
	RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTRRQLRENA					
HLA-A*01:01	LTDSEMKNL					
HLA-A*01:01	LTDSEMKNLF					
HLA-A*03:01	KLFETRRL					
HLA-A*03:01	KLFETRRLR					
HLA-A*24:02	KYVEDTKIDLW					
HLA-A*26:01	DTKIDLWSY					
HLA-B*08:01	HTIDLTDSEM					
HLA-B*39:01	FETRRL					
HLA-B*39:01	YNAELLVAL					
HLA-B*39:01	WSYNAELLVAL					
HLA-B*40:01	VEDTKIDL					
HLA-B*40:01	LENQHTIDL					

Рис. 2. А – экспериментальные В- и CD4+ Т-клеточные эпитопы, гомологичные фрагменту консенсусной последовательности HA2 (76–130) фрагмента более чем на 90%. Представлен результат поиска по базе данных IEDB, неомологичные аминокислоты выделены красным, зеленым цветом отмечен В-клеточный эпитоп. Б – потенциальные CD8+ Т-клеточные эпитопы в составе фрагмента HA2 (76–130) для репрезентативного набора аллелей HLA, результат анализа с использованием NetCTLpan1.1 Server [38]

4M2e-HA2 показало сохранение α-спирализации в участке HA2 (76–130) независимо от места их присоединения к флагеллину (рис. 4). Можно предположить, что нативная структура этого фрагмента HA2 скорее всего сохранена, и гибридные белки способны стимулировать образование антител, в том числе к структурным эпитопам, характерным для нативного HA. Однако между двумя белками существуют некоторые различия. В случае концевое присоединения HA2 структура антигена более компактна. 3D-структура четырех копий M2e существенно различалась в двух моделях рекомбинантных белков. Внутренняя локализация четырех копий M2e приводила к появлению частичной α-спирализации (Flg-4M2e-HA2), не характерной для нативной конформации M2e на поверхности вириона или инфицированной вирусом гриппа клетке (рис. 4). Концевое расположение M2e (Flg-HA2-4M2e) в большей степени сохраняло нативную конформацию M2e, неструктурированную в белке M2. Подобные конформационные различия в структуре двух белков могут влиять на их иммуногенность.

Получение и очистка рекомбинантных белков

Нуклеотидные последовательности, кодирующие гибридные белки Flg-4M2e-HA2 и Flg-HA2-4M2e, были клонированы в вектор pQE30 и экспрессированы в штамме *E. coli* DLT1270 (рис. 5А). Теоретически рассчитанная молекулярная масса белков составляла 73.9 кДа, что совпадало с величиной, определенной по их электрофоретической подвижности в ПААГ (рис. 5Б). Очищенные белки Flg-4M2e-HA2 и Flg-HA2-4M2e взаимодействовали в вестерн-блот с моноклональными анти-M2e-антителами 14C2 (рис. 5Б). Поскольку показано, что антитела 14C2 распознают

M2h – консенсусная последовательность M2e вирусов гриппа А человека:
SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
M2k – M2e A/Курган/05/2005 H5N1:
SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD
HA2 – фрагмент HA2 (76–130) филогенетической группы II вирусов гриппа:
RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTRRQLRENA

Flg-HA2-4M2e



Flg-4M2e-HA2



Рис. 3. Структура рекомбинантных белков Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2. Синий блок – флагеллин *S. typhimurium*; оранжевый блок – консенсусная последовательность M2e вирусов гриппа А человека; зеленый блок – M2e-пептид вируса гриппа А/Курган/5/05 RG (H5N1); желтый блок – фрагмент HA2 (76–130) вирусов гриппа филогенетической группы II

протективный эпитоп M2e [14, 43], полученные результаты подтверждают, что пептид M2e присутствует в обоих белках. Оба рекомбинантных белка были достаточно стабильными. Не выявлено признаков деградации белков при их хранении в течение 2 месяцев при 4°C (рис. 5В).

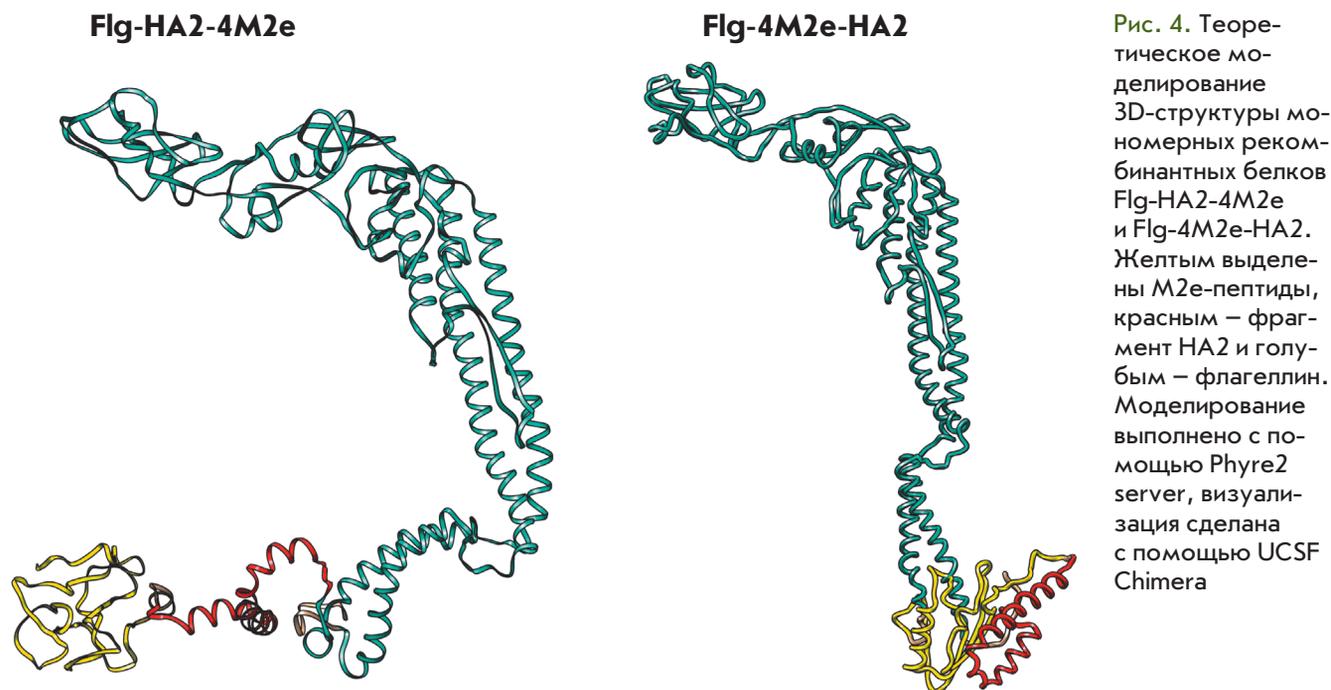


Рис. 4. Теоретическое моделирование 3D-структуры мономерных рекомбинантных белков Flg-NA2-4M2e и Flg-4M2e-NA2. Желтым выделены M2e-пептиды, красным – фрагмент HA2 и голубым – флагеллин. Моделирование выполнено с помощью Phyre2 server, визуализация сделана с помощью UCSF Chimera

Сравнение иммуногенности рекомбинантных белков Flg-NA2-4M2e и Flg-4M2e-NA2

Иммуногенность гибридных белков Flg-NA2-4M2e и Flg-4M2e-NA2 оценивали на мышах Balb/c, иммунизированных 3 раза, интраназально. На 14-й день после третьей иммунизации в сыворотках и БАЛ пяти мышей каждой группы определяли присутствие анти-M2e- и анти-A/H3N2-антител в ИФА. Не выявлено различий в уровнях анти-M2eh- и анти-M2ek-IgG в сыворотках мышей, иммунизированных Flg-NA2-4M2e и Flg-4M2e-NA2 ($p > 0.05$) (рис. 6А). Но средний геометрический титр (СГТ) анти-M2e-IgG после иммунизации рекомбинантным белком Flg-NA2-4M2e был в 4-6 раз выше, чем у мышей, иммунизированных Flg-4M2e-NA2. Уровень анти-NA2-IgG к вирусу гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) также был значительно выше (рис. 6Б) у мышей, иммунизированных Flg-NA2-4M2e (различия между двумя белками были статистически значимыми, $p = 0.0317$).

Для изучения IgA- и IgG-специфического ответа на мукозальных поверхностях определяли титры M2eh- и M2ek-специфических IgA и IgG в БАЛ пяти мышей каждой группы через 14 дней после третьей иммунизации. Как показано на рис. 7, интраназальная иммунизация гибридным белком Flg-NA2-4M2e стимулировала более высокие уровни IgG- и IgA анти-M2e в БАЛ, чем белок Flg-4M2e-NA2 ($p < 0.05$). Эти результаты показывают, что гибридный белок с концевым положением M2e-пептидов (Flg-NA2-

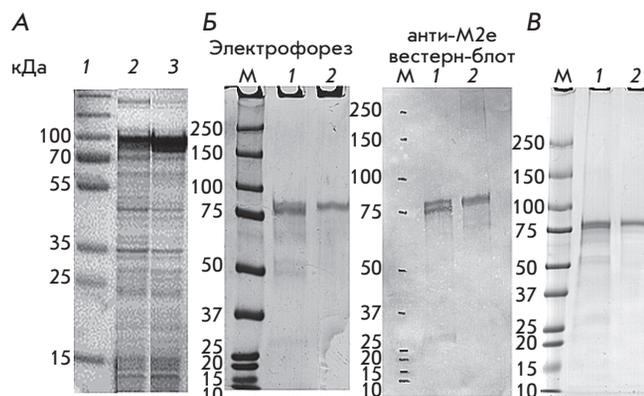


Рис. 5. А – экспрессия рекомбинантных белков в клетках *E. coli*. На дорожке 1 представлены маркеры молекулярной массы в кДа (Fermentas, EC); 2 – лизат клеток, трансформированных плазмидой pQE30 Flg_NA2_4M2e после индукции; 3 – лизат клеток, трансформированных плазмидой pQE30 Flg_4M2e_NA2 после индукции; Б – рекомбинантные белки Flg-NA2-4M2e и Flg-4M2e-NA2 после хроматографической очистки на Ni-сорбенте. Представлен результат электрофореза, а также вестерн-блот с использованием моноклональных анти-M2e-антител 14C2; В – рекомбинантные белки Flg-NA2-4M2e и Flg-4M2e-NA2 через 2 месяца хранения при 4°C. Представлены результаты электрофореза: М – маркер молекулярной массы, 1 – Flg-NA2-4M2e, 2 – Flg-4M2e-NA2

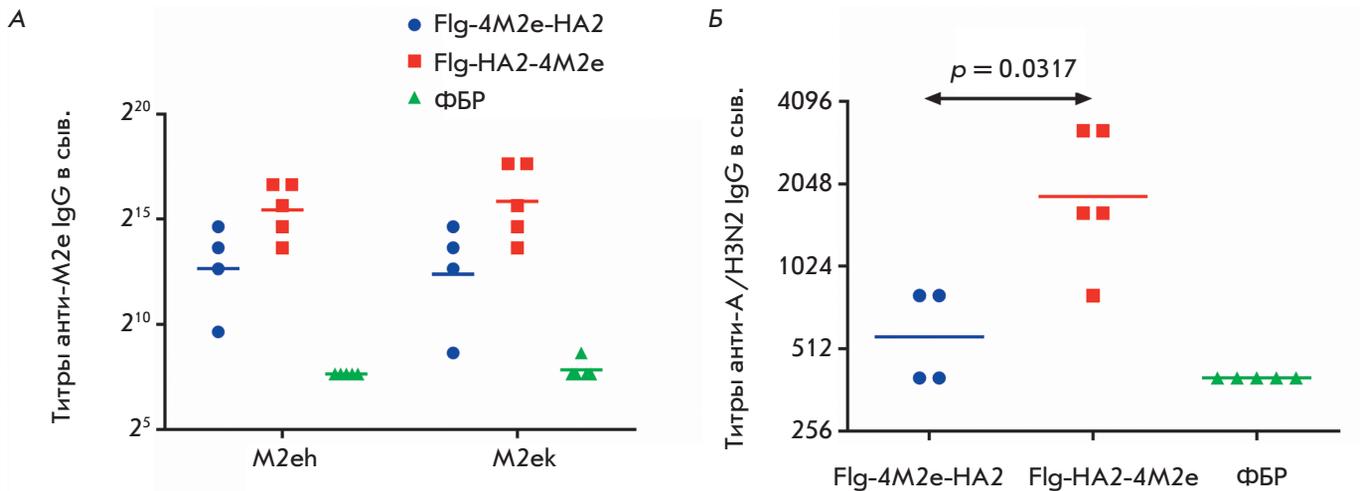


Рис. 6. Титры антител у мышей экспериментальных и контрольной групп через 2 недели после третьей иммунизации гибридными белками Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2. Титры сывороточных IgG к целевым антигенам: M2e пептидам (А) и к вирусу гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) (Б)

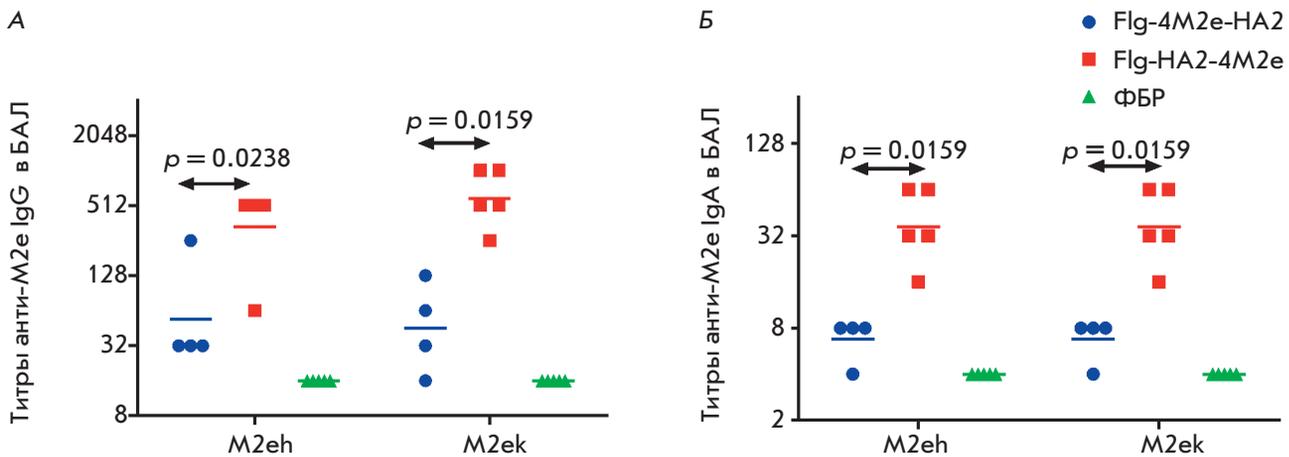


Рис. 7. Титры антител в БАЛ к пептидам M2e у мышей экспериментальных и контрольной групп через 2 недели после третьей иммунизации гибридными белками Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2: СГТ IgG (А) и СГТ IgA (Б)

4M2e) был более иммуногенным, чем белок с внутренней локализацией этих пептидов (Flg-4M2e-HA2).

Сравнение протективных свойств рекомбинантных белков Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2

Для сравнения протективных свойств гибридных белков мышей (по восемь в каждой группе), иммунизированных гибридными белками Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2, заражали вирусом гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) в дозе 5LD₅₀ через 14 дней после

третьей иммунизации. В качестве контроля в опыте по летальному заражению использовали мышей, которым интраназально вводили ФБР. В течение 14 дней после заражения ежедневно оценивали падение массы тела (показатель тяжести гриппозной инфекции) и выживаемость. Из рис. 8А видно, что у мышей, иммунизированных Flg-HA2-4M2e, максимальная потеря массы тела составила 13% на 4-й день после заражения, а у мышей, иммунизированных гибридным белком Flg-4M2e-HA2, – 20% на 8-й день после заражения. Максимальная потеря массы тела у кон-

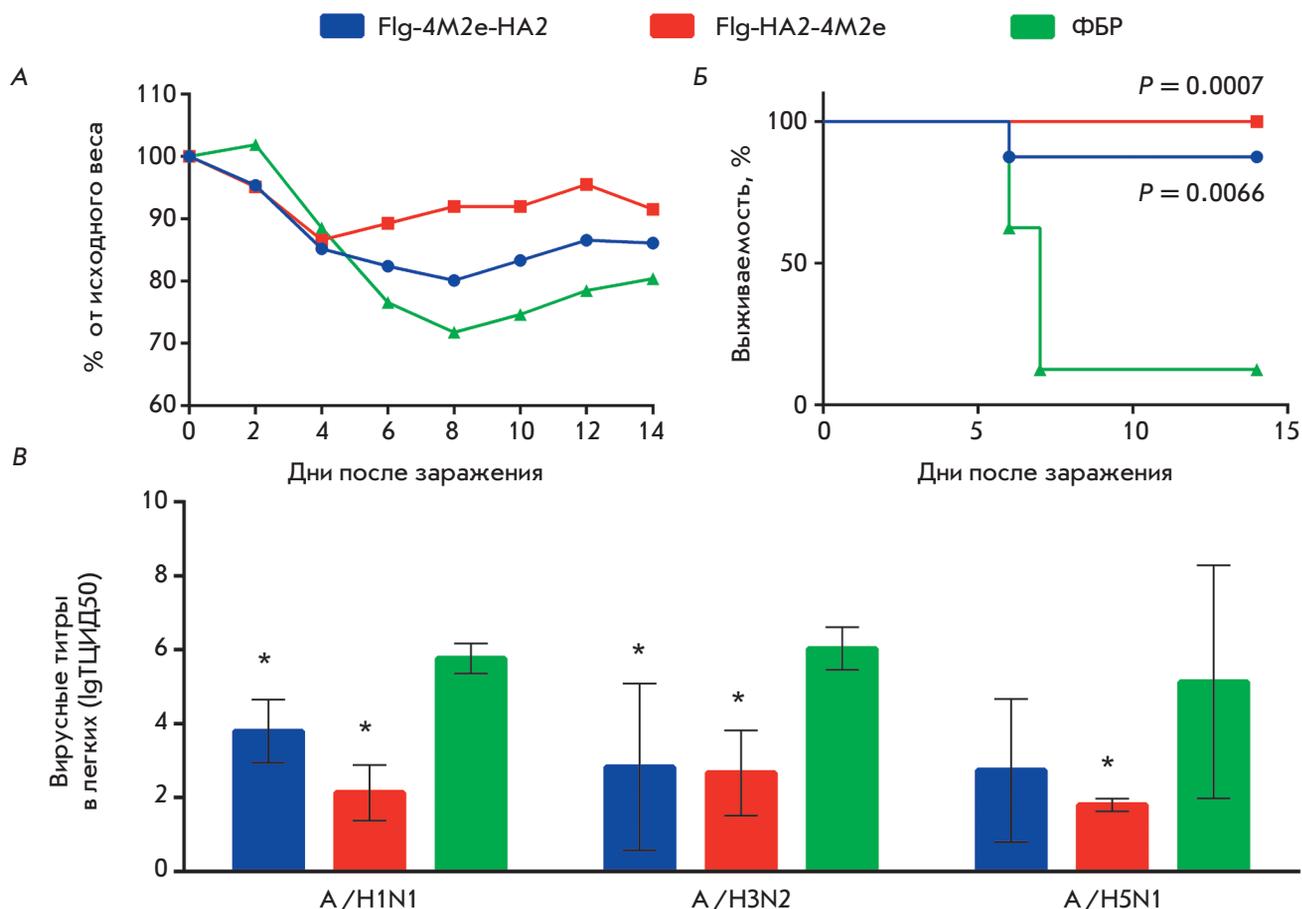


Рис. 8. Протективность рекомбинантных белков Flg-NA2-4M2e и Flg-4M2e-NA2. Через 2 недели после третьей иммунизации мышей интраназально заражали вирусом гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) в дозе 5LD₅₀. Динамику массы тела (А) и гибели мышей (Б) наблюдали ежедневно в течение 14 дней. Значение *p* высчитывали с помощью критерия Мантела–Кокса. В – репродукция вируса гриппа в легких мышей. Через 2 недели после третьей иммунизации мышей интраназально заражали вирусом гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2), А/PR/8/34 (H1N1) и А/Курган/5/05 (H5N1) в дозе 5LD₅₀. Вирусные титры определяли на 6-й день после заражения. Результаты представлены в lg ТЦИД50. Нижний предел определения – 0.5 lg ТЦИД50. Статистическое отличие от контрольной группы определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. *Статистически значимое отличие от контрольной группы, *p* < 0.05

трольных животных, также отмеченная на 8-й день, составила 28%. Полученные данные свидетельствуют о более легком течении инфекции у мышей, получавших гибридный белок Flg-NA2-4M2e. Иммунизация гибридным белком Flg-NA2-4M2e обеспечивала полную защиту (*рис. 8Б*) от летального заражения (выживаемость 100%), тогда как выживаемость мышей, получавших Flg-4M2e-NA2, составила 87.5%, а контрольных животных – 12.5% (статистически значимое отличие опытных групп от контрольных, *p* = 0.0007 и *p* = 0.0066, критерий Montel-Cox).

Для определения титров вируса в легких через 2 недели после окончания протокола иммунизации

мышей опытных и контрольной групп (по три особи каждой группы) интраназально заражали вирусами гриппа А/PR/8/34 (H1N1), А/Аичи/2/68 (H3N2) и А/Курган/05/05 (H5N1) в дозе 5LD₅₀. На 6-й день после заражения мышей скарифицировали для титрования остаточного количества вирусов гриппа в легких. Мы наблюдали значительное снижение вирусных титров в легких иммунизированных мышей по сравнению с контрольными (*рис. 8В*). Иммунизация мышей гибридным белком Flg-NA2-4M2e снижала титр вируса в легких на 3.7, 3.3 и 3.3 log₁₀ при заражении вирусами гриппа А/PR/8/34 (H1N1), А/Аичи/2/68 (H3N2) и А/Курган/05/05

(H5N1) соответственно, что статистически значимо отличалось от значений в контроле ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни). Гибридный белок Flg-4M2eh-NA2 приводил к менее выраженному снижению репродукции вирусов в легких (на 2.0, 3.2 и 2.4 log₁₀ соответственно), однако отличия от контроля были выявлены ($p < 0.05$).

ВЫВОДЫ

Высококонсервативный эктодомен белка M2 и консервативные регионы второй субъединицы HA являются перспективными антигенами для создания вакцин с широким протективным потенциалом. Вакцинный белок, содержащий два или более консервативных таргетных антигена, стимулирующих формирование различных звеньев иммунного ответа (антител с различным механизмом действия, CD4⁺, CD8⁺ Т-лимфоцитов), позволит усилить эффективность таких препаратов. Гибридный белок на основе флагеллина и консервативных фрагментов двух белков вируса гриппа (M2e и HA2 76–130) сочетает адъювантную активность флагеллина, обусловленную его специфическим связыванием с TLR5, консервативность M2e среди вирусов гриппа А человека и птиц (формирование не нейтрализующих антител с механизмом действия, связанным с АЗКЦ) и консервативность участка стеблевой части молекулы гемагглютинаина, содержащей потенциальные В-клеточные (формирование нейтрализующих и не нейтрализующих антител), а также CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные эпитопы.

Сконструированы два рекомбинантных белка с различным порядком присоединения к С-концу флагеллина M2e-пептидов разных подтипов вирусов гриппа А и консервативного фрагмента второй субъ-

единицы гемагглютинаина вирусов гриппа второй филогенетической группы. Показана возможность получения стабильного рекомбинантного белка с двумя таргетными антигенами (гетерологичного M2e и HA2 (76–30)), слитыми с флагеллином. Такой белок обладает иммуногенностью, стимулирует формирование антител как к M2e, так и антител, связывающихся с HA вируса гриппа. Рекомбинантный белок защищал мышей от летального заражения и значительно снижал вирусную нагрузку в легких. Показано, что порядок расположения таргетных антигенов в рекомбинантном белке может влиять на третичную структуру рекомбинантного белка, а также на его иммуногенность и протективный эффект. Выявлены различия в уровне продукции антител двумя гибридными белками, что свидетельствует о большей иммуногенности гибридного белка с концевым положением M2e, чем белка с концевым положением HA2. Протективный эффект двух белков также различался. Белок с концевым расположением M2e приводил к полной защите животных от летального заражения вирусом гриппа А/Н3N2 и быстрое восстановление их веса после небольшого снижения. Кроме того, высокую эффективность белка Flg-HA2-4M2e подтверждает также более выраженное снижение вирусной нагрузки в легких мышей по сравнению с белком Flg-4M2eh-NA2.

Дальнейшие исследования будут направлены на выяснение роли каждого из таргетных антигенов в составе слитого белка в формировании протективного иммунитета, длительности его сохранения и широты защитного действия. ●

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 15-14-00043).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fan J., Liang X., Horton M.S., Perry H.C., Citron M.P., Heidecker G.J., Fu T.M., Joyce J., Przysiecki C.T., Keller P.M., et al. // *Vaccine*. 2004. V. 22. № 23–24. P. 2993–3003.
- Huleatt J.W., Nakaar V., Desai P., Huang Y., Hewitt D., Jacobs A., Tang J., McDonald W., Song L., Evans R.K., et al. // *Vaccine*. 2008. V. 26. № 2. P. 201–214.
- Fiers W., De Filette M., El Bakkouri K., Schepens B., Roose K., Schotsaert M., Birkett A., Saelens X. // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 45. P. 6280–6283.
- Schotsaert M., De Filette M., Fiers W., Saelens X. // *Expert Rev. Vaccines*. 2009. V. 8. № 4. P. 499–508.
- Turley C.B., Rupp R.E., Johnson C., Taylor D.N., Wolfson J., Tussey L., Kavita U., Stanberry L., Shaw A. // *Vaccine*. 2011. V. 29. № 32. P. 5145–5152.
- Stepanova L.A., Kotlyarov R.Y., Kovaleva A.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., Sergeeva M.V., Kasianenko M.A., Kuprianov V.V., Ravin N.V., Tsybalova L.M., et al. // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 3. P. e0119520.
- Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Kuprianov V.V., Blokhina E.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., Gorshkov A.N., Kasyanenko M.A., Ravin N.V., Kiselev O.I. // *Vaccine*. 2015. V. 33. № 29. P. 3398–3406.
- Neiryneck S., Deroo T., Saelens X., Vanlandschoot P., Jou W.M., Fiers W. // *Nat. Med*. 1999. V. 5. № 10. P. 1157–1163.
- Mozdanovska K., Maiese K., Furchner M., Gerhard W. // *Virology*. 1999. V. 254. № 1. P. 138–146.
- Tompkins S.M., Zhao Z.C., Lo C.Y., Misplon J.A., Liu T., Ye Z., Hogan R.J., Wu Z., Benton K.A., Tumpey T.M., Epstein S.L. // *Emerg. Infect. Dis*. 2007. V. 13. № 3. P. 426–435.
- Beerli R.R., Bauer M., Schmitz N., Buser R.B., Gwerder M., Muntwiler S., Renner W.A., Saudan P., Bachmann M.F. // *Virology*. 2009. V. 6. P. 224–235.
- Jegerlehner A., Schmitz N., Storni T., Bachmann M.F. // *J. Immunol*. 2004. V. 172. P. 5598–5605.
- El Bakkouri K., Descamps F., De Filette M., Smet A., Festjens E., Birkett A., van Rooijen N., Verbeek S., Fiers W., Saelens X. // *J. Immunol*. 2011. V. 186. P. 1022–1031.

14. Treanor J.J., Tierney E.L., Zebedee S.L., Lamb R.A., Murphy B.R. // *J. Virol.* 1990. V. 64. P. 1375–1377.
15. Gerhard W., Mozdzanowska K., Zharikova D. // *Emerg. Infect. Dis.* 2006. V. 12. № 14. P. 569–574.
16. Trosby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L.L., Alard P., Cornelissen L., Bakker A., Cox F., van Deventer E., Guan Y., et al. // *PLoS One.* 2008. V. 3. № 12. P. e3942.
17. Prabhu N., Prabakaran M., Ho H.T., Velumani S., Qiang J., Goutama M., Kwang J. // *J. Virol.* 2009. V. 83. № 6. P. 2553–2562.
18. Wang T.T., Tan G. S., Hai R., Pica N., Petersen E., Moran T.M., Peter Palese P. // *PLoS Pathogens.* 2010a. V. 6. № 2. P. e1000796.
19. Wei C.J., Boyington J.C., McTamney P.M., Kong W.P., Pearce M.B., Xu L., Andersen H., Rao S., Tumpey T.M., Yang Z.Y., et al. // *Science.* 2010. V. 329. № 5995. P. 1060–1064.
20. Corti D., Voss J., Gambelin S.J., Codoni G., Macagno A., Jarrossay D., Vachieri S.G., Pinna D., Minola A., Vanzetta F., et al. // *Science.* 2011. V. 333. № 6044. P. 850–856.
21. Wrammert J., Koutsouanos D., Li G.M., Edupuganti S., Sui J., Morrissey M., McCausland M., Skountzou I., Hornig M., Lipkin W.I., et al. // *J. Exp. Med.* 2011. V. 208. № 1. P. 181–193.
22. Ekiert D.C., Friesen R.H., Bhabha G., Kwaks T., Jongeneelen M., Yu W., Ophorst C., Cox F., Korse H.J., Brandenburg B., et al. // *Science.* 2011. V. 333. № 6044. P. 843–850.
23. Wang T.T., Tan G.S., Hai R., Pica N., Ngai L., Ekiert D.C., Wilson I.A., Garcia-Sastre A., Moran T.M., Palese P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010b. V. 107. № 44. P. 18979–18984.
24. Bommakanti G., Citron M.P., Hepler R.W., Callahan C., Heidecker G.J., Najar T.A., Lu X., Joyce J.G., Shiver J.W., Casimiro D.R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 31. P. 13701–13706.
25. Schneemann A., Speir J.A., Tan G.S., Khayat R., Ekiert D.C., Matsuoka Y., Wilson I.A. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 21. P. 11686–11697.
26. Stanekova Z., Adkins I., Kosova M., Janulíková J., Sebo P., Vareckova E. // *Antiviral Res.* 2013. V. 97. № 1. P. 24–35.
27. Stepanova L.A., Sergeeva M.V., Shuklina M.A., Shaldzhyan A.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., Tsybalova L.M. // *Acta Naturae.* 2016. V. 8. № 2. P. 116–126.
28. Delaney K.N., Phipps J.P., Johnson J.B., Mizel S.B. // *Viral Immunol.* 2010. V. 23. P. 201–210.
29. Cuadros C., Lopez-Hernandez F.G., Dominguez A.L., McClelland M., Lustgarten J. // *Infect. Immun.* 2004. V. 72. P. 2810–2816.
30. Honko A.N., Sriranganathan N., Lees C.J., Mizel S.B. // *Infect. Immun.* 2006. V. 74. P. 1113–1120.
31. Bates J.T., Honko A.N., Graff A.H., Kock N., Mizel S.B. // *Mech. Ageing Dev.* 2008. V. 129. P. 271–281.
32. Song L., Zhang Y., Yun N.E., Poussard A.L., Smith J.N., Smith J.K., Borisevich V., Linde J.J., Zacks M.A., Li H., et al. // *Vaccine.* 2009. V. 27. № 42. P. 5875–5884.
33. Wang B.-Z., Xu R., Quan F.-S., Kang S.M., Wang L., Compans R.W. // *PLoS One.* 2010. V. 5. P. e13972.
34. Liu G., Tarbet B., Song L., Reiserova L., Weaver B., Chen Y., Li H., Hou F., Liu X., Parent J., et al. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 6. P. e20928.
35. Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. № 14. P. 3059–3066.
36. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. № 8. P. 1166–1167.
37. Vita R., Zarebski L., Greenbaum J.A., Emami H., Hoof I., Sallimi N., Damle R., Sette A., Peters B. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. Database issue. P. D854–D862.
38. Stranzl T., Larsen M.V., Lundegaard C., Nielsen M. // *Immunogenetics.* 2010. V. 62. № 6. P. 357–368.
39. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. // *J. Comput. Chem.* 2004. V. 25. № 13. P. 1605–1612.
40. Kelley L.A., Sternberg M.J. // *Nat. Protoc.* 2009. V. 4. № 3. P. 363–371.
41. Grant S., Jessee J., Bloom F., Hanahan D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. № 12. P. 4645–4649.
42. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
43. Zharikova D., Mozdzanowska K., Feng J., Zhang M., Gerhard W. // *J. Virol.* 2005. V. 79. P. 6644–6654.