

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 М2е-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 (М2, 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

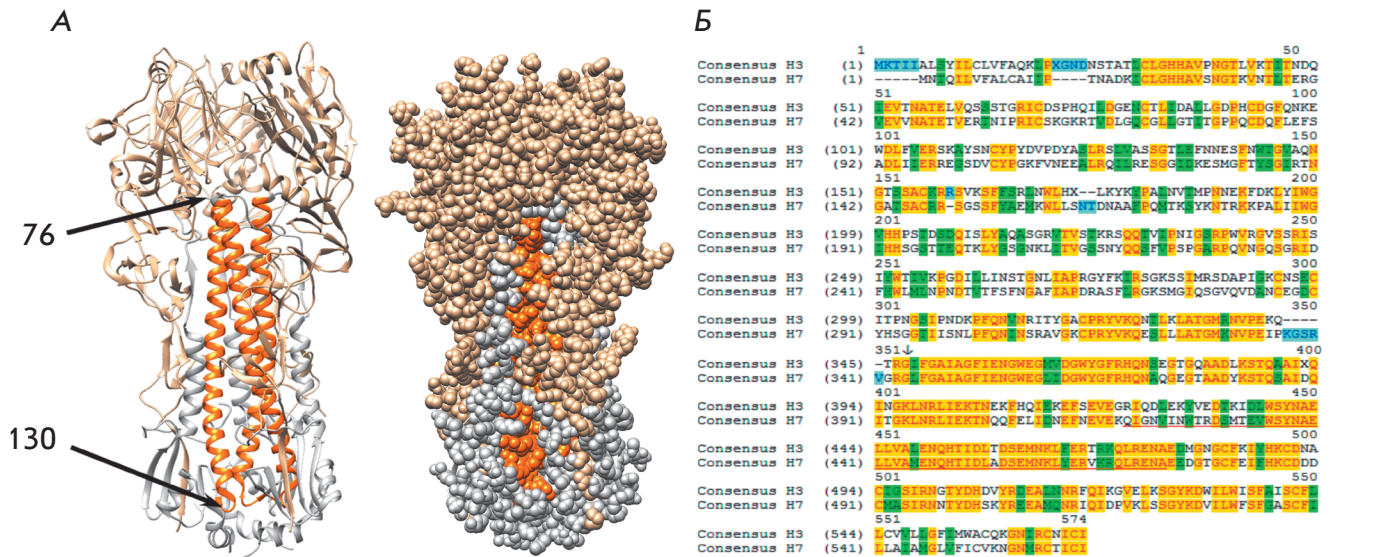


Рис. 1. А – 3D-структура (тример, модель 4JTV RCSB Protein Data Bank) молекулы гемагглютинаина (HA) вируса гриппа А/Н3N2 (филогенетическая группа II): бежевым выделена субъединица HA1, серым – субъединица HA2, оранжевым – фрагмент HA2 76–130. Б – выравнивание консенсусных последовательностей HA вирусов гриппа А/Н3N2 и А/Н7 (включая человеческие изоляты) филогенетической группы II. Начало субъединицы HA2 указано стрелкой, фрагмент HA2 76–130 подчеркнут красным, желтым цветом обозначено полное совпадение последовательностей, зеленым – замены на близкие по свойствам аминокислоты, без цвета – аминокислотные замены, голубым – инсерции

76–103 (рис. 2А). Кроме того, участок HA2 (76–130) вирусов гриппа второй филогенетической группы содержит потенциальные CD8+ Т-клеточные эпитопы для различных аллелей HLA (рис. 2Б).

Дизайн рекомбинантных белков

В качестве консервативных пептидов, предназначенных для включения в состав рекомбинантных вакцин, были выбраны: «консенсусная» последовательность штаммов вируса гриппа А человека (M2eh), M2e вируса гриппа А/Курган/05/200 H5N1 (M2ek), фрагмент второй субъединицы HA (76–130) вирусов гриппа филогенетической группы II (рис. 3).

Были созданы химерные гены, кодирующие гибридные белки, включающие последовательность флагеллина бактерии *S. typhimurium*, к С-концу которого в различных сочетаниях были присоединены M2e-пептид разных подтипов вируса гриппа, а также консервативные фрагменты второй субъединицы гемагглютинаина вирусов гриппа второй филогенетической группы (рис. 3). Рекомбинантный белок Flg-HA2-4M2e содержит последовательность флагеллина, к С-концу которой присоединен фрагмент второй субъединицы (76–130) HA вирусов гриппа филогенетической группы II, за которым следуют четыре копии M2e (M2h-M2k-M2h-M2k).

Белок Flg-4M2e-HA2 содержит последовательность флагеллина, к С-концу которой присоединены четыре копии M2e (M2h-M2k-M2h-M2k) и фрагмент второй субъединицы (76–130) HA вирусов гриппа филогенетической группы II. В этих белках последовательности M2e отделены друг от друга и от HA2 глицин-богатыми линкерами. «Сборку» химерных генов из отдельных компонентов проводили непосредственно в экспрессионном векторе pQE30. Ген флагеллина без собственного стартового кодона клонировали в сайт BamHI вектора, что обеспечивало экспрессию флагеллина с присоединенным к нему кодируемым вектором N-концевым 6His-тагом, предназначенным для очистки рекомбинантных белков методом металл-аффинной хроматографии.

Химерные гены получали с использованием стандартных методов генной инженерии. Ген флагеллина был получен ранее с помощью ПЦР на геномной ДНК *S. typhimurium* и клонирован. Нуклеотидные последовательности, кодирующие HA2 и tandemные копии M2e, синтезировали *in vitro*. Таким образом, созданы векторы pQE30_Flg_HA2-4M2e и pQE30_Flg_4M2e-HA2, позволяющие получать соответствующие рекомбинантные белки.

Гомологичное моделирование трехмерной структуры рекомбинантных белков Flg-HA2-4M2e и Flg-

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 | KLFETRRL | | | | | |
| 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

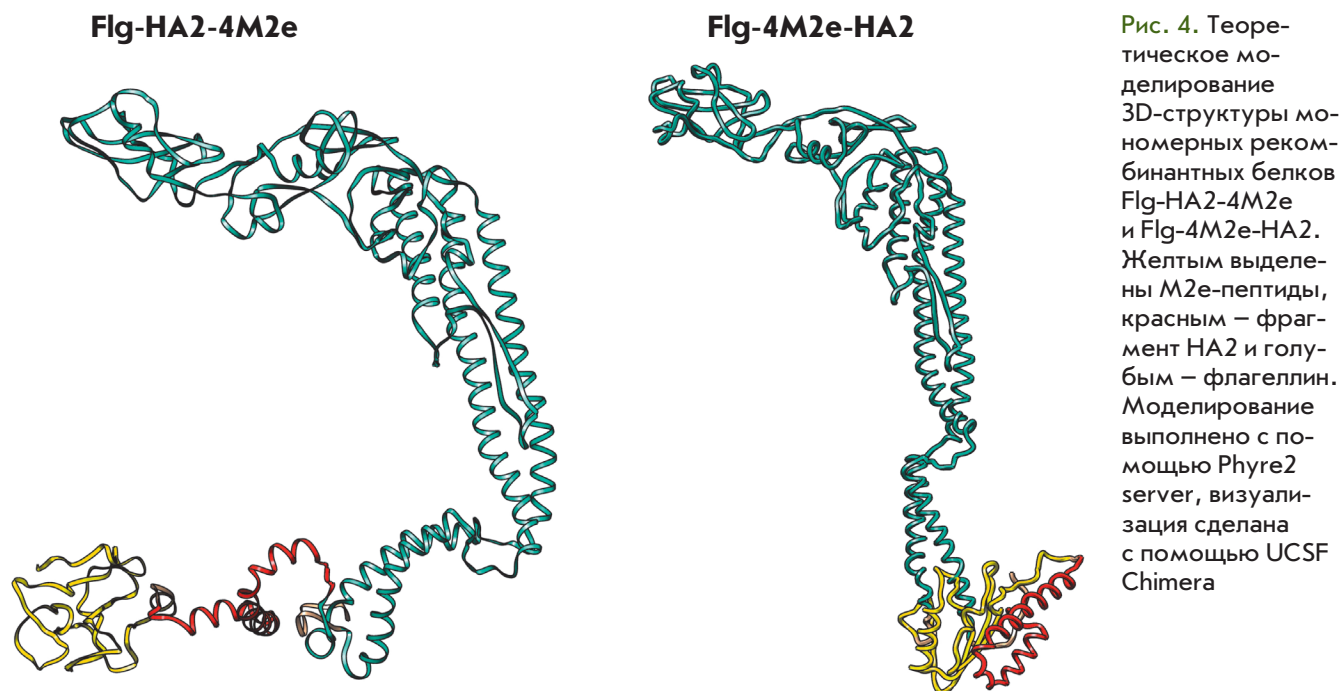


Flg-4M2e-HA2



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).



Сравнение иммуногенности рекомбинантных белков Flg-НА2-4М2е и Flg-4М2е-НА2

Иммуногенность гибридных белков Flg-НА2-4М2е и Flg-4М2е-НА2 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-М2е- и анти-А/Н3N2-антител в ИФА. Не выявлено различий в уровнях анти-М2еh- и анти-М2еk-IgG в сыворотках мышей, иммунизированных Flg-НА2-4М2е и Flg-4М2е-НА2 ($p > 0.05$) (рис. 6А). Но средний геометрический титр (СГТ) анти-М2е-IgG после иммунизации рекомбинантным белком Flg-НА2-4М2е был в 4-6 раз выше, чем у мышей, иммунизированных Flg-4М2е-НА2. Уровень анти-НА2-IgG к вирусу гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) также был значительно выше (рис. 6Б) у мышей, иммунизированных Flg-НА2-4М2е (различия между двумя белками были статистически значимыми, $p = 0.0317$).

Для изучения IgA- и IgG-специфического ответа на мукозальных поверхностях определяли титры М2еh- и М2еk-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-НА2-4М2е стимулировала более высокие уровни IgG- и IgA анти-М2е в БАЛ, чем белок Flg-4М2е-НА2 ($p < 0.05$). Эти результаты показывают, что гибридный белок с концевым положением М2е-пептидов (Flg-НА2-

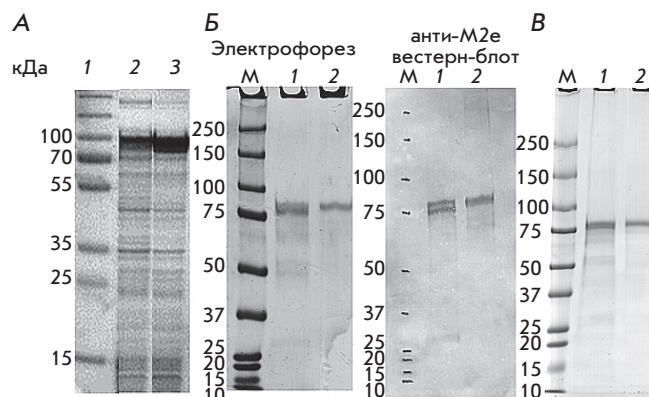


Рис. 5. А – экспрессия рекомбинантных белков в клетках *E. coli*. На дорожке 1 представлены маркеры молекулярной массы в кДа (Fermentas, EC); 2 – лизат клеток, трансформированных плазмидой pQE30 Flg_НА2_4М2е после индукции; 3 – лизат клеток, трансформированных плазмидой pQE30 Flg_4М2е_НА2 после индукции; Б – рекомбинантные белки Flg-НА2-4М2е и Flg-4М2е-НА2 после хроматографической очистки на Ni-сорбенте. Представлен результат электрофореза, а также вестерн-блот с использованием моноклональных анти-М2е-антител 14С2; В – рекомбинантные белки Flg-НА2-4М2е и Flg-4М2е-НА2 через 2 месяца хранения при 4°C. Представлены результаты электрофореза: М – маркер молекулярной массы, 1 – Flg-НА2-4М2е, 2 – Flg-4М2е-НА2

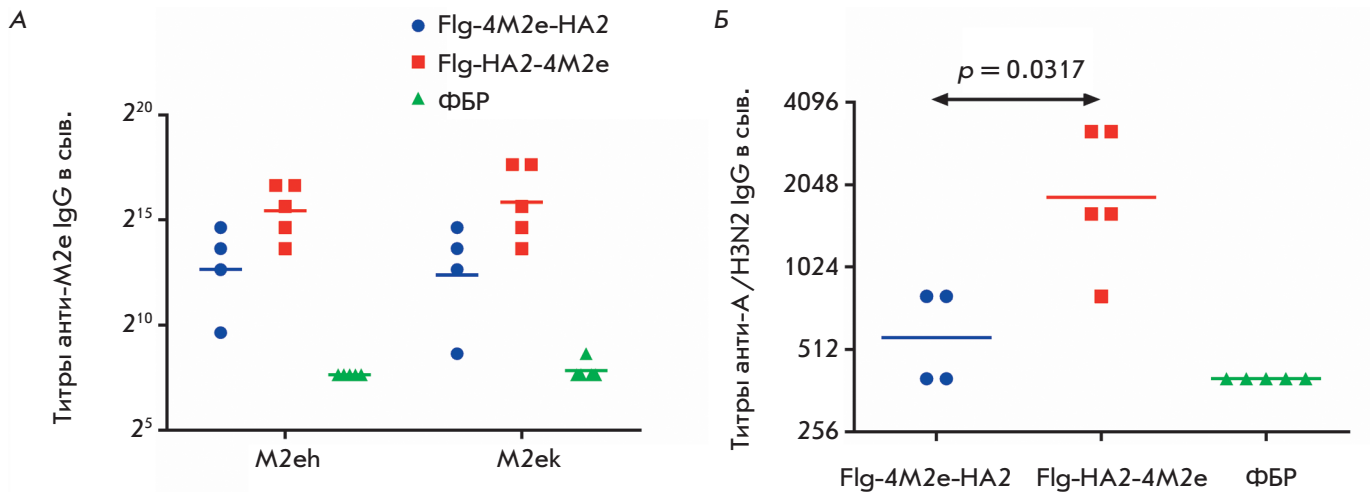


Рис. 6. Титры антител у мышей экспериментальных и контрольной групп через 2 недели после третьей иммунизации гибридными белками Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2. Титры сывороточных IgG к целевым антигенам: M2e пептидам (А) и к вирусу гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) (Б)

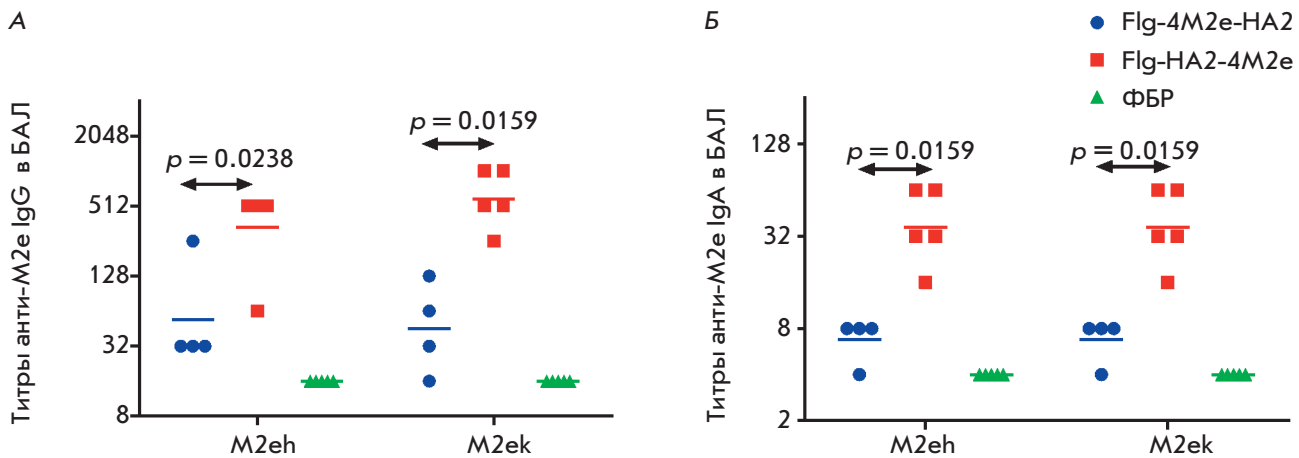


Рис. 7. Титры антител в БАЛ к пептидам M2e у мышей экспериментальных и контрольной групп через 2 недели после третьей иммунизации гибридными белками Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2: СГТ IgG (А) и СГТ IgA (Б)

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-

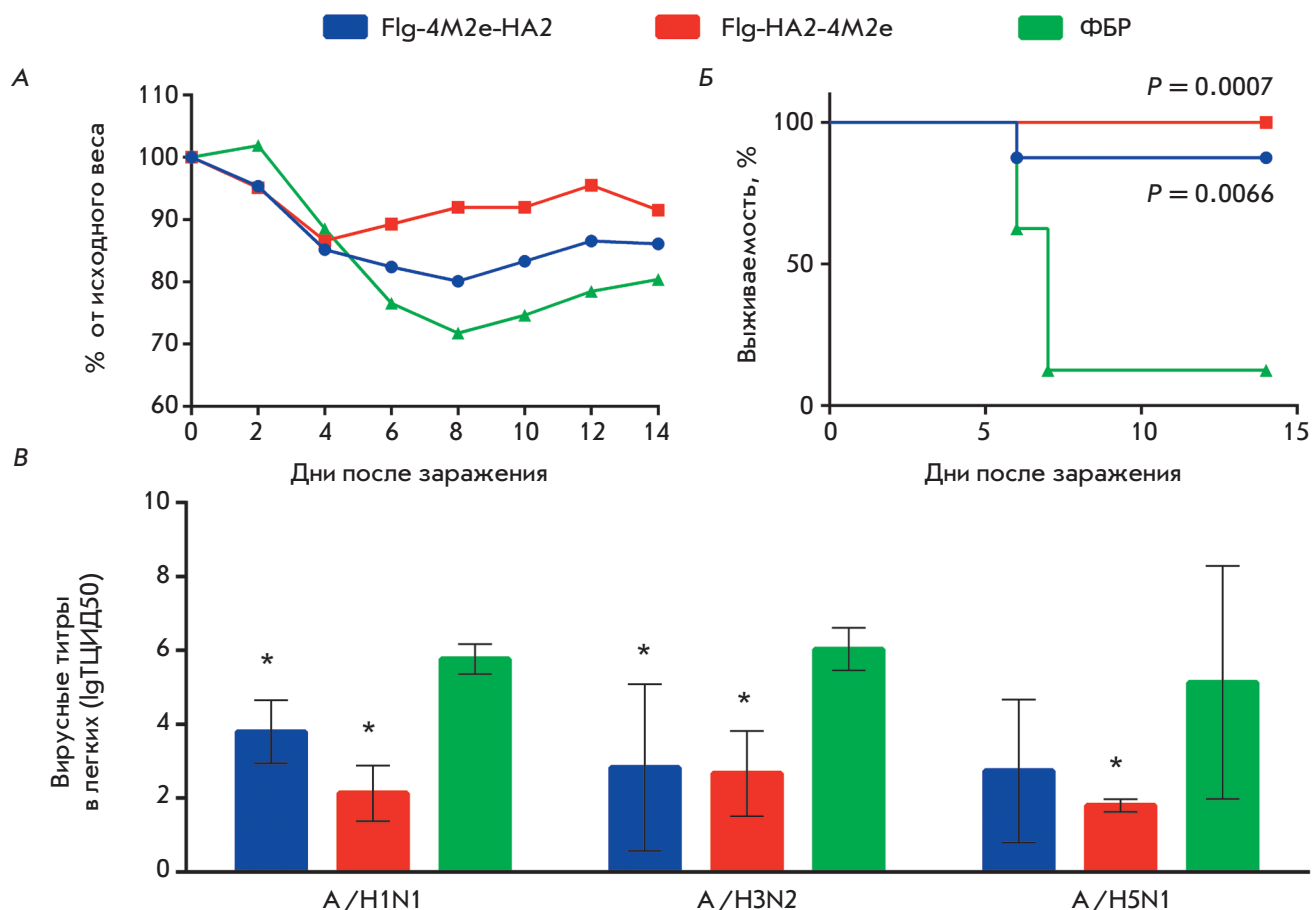


Рис. 8. Протективность рекомбинантных белков Flg-NA2-4M2e и Flg-4M2e-NA2. Через 2 недели после третьей иммунизации мышей интраназально заражали вирусом гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) в дозе 5LD₅₀. Динамику массы тела (А) и гибели мышей (Б) наблюдали ежедневно в течение 14 дней. Значение *p* высчитывали с 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.