

УДК 602.64:578.2

Гибридный белок на основе второй субъединицы гемагглютинаина вирусов гриппа А/Н2N2 формирует перекрестный иммунитет

Л. А. Степанова*, М. В. Сергеева, М. А. Шуклина, А. А. Шалджян, М. В. Потапчук, А. В. Коротков, Л. М. Цыбалова

Научно-исследовательский институт гриппа МЗ РФ, 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 15/17

*E-mail: stepanova160@mail.ru

Поступила в редакцию 21.09.2015

Принята к печати 08.02.2016

РЕФЕРАТ Консервативные участки второй субъединицы гемагглютинаина (НА2) представляют интерес для дизайна вакцинных конструкций, способных обеспечить протективный иммунитет против вирусов гриппа А различных подтипов. На основе флагеллина и высококонсервативного фрагмента НА2 (35–107) вирусов гриппа подтипа А/Н2N2, содержащего В-клеточные, CD4+ Т-клеточные, а также CD8+ Т-клеточные эпитопы, сконструирован гибридный рекомбинантный белок FlgМН. Нативная конформация фрагмента НА2 частично сохранялась при присоединении к С-концу флагеллина в составе гибридного рекомбинантного белка FlgМН. Показано, что FlgМН стимулирует формирование смешанного Th1/Th2-ответа на целевую последовательность, перекрестно реагирующих антител, связывающихся с вирусами гриппа первой филогенетической группы (Н1, Н2, Н5), и индукцию специфических цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+ИФН- γ). Иммунизация рекомбинантным белком защищала животных от летальной гриппозной инфекции. Сконструированный белок FlgМН перспективен для включения в противогриппозную вакцину широкого спектра действия, способную стимулировать Т- и В-клеточный иммунный ответ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вакцина, грипп, НА2, рекомбинантный белок, флагеллин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ НА2 – вторая субъединица гемагглютинаина; Flg – флагеллин; FlgМН – гибридный белок, включающий флагеллин и консервативный участок НА2 вирусов гриппа А/Н2N2; БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж; ИФА – иммуноферментный анализ; ОП – оптическая плотность; СГТ – среднегеометрический титр; TLR5 – Toll-подобный рецептор 5; МНС – главный комплекс гистосовместимости.

ВВЕДЕНИЕ

Вируснейтрализующие антитела предотвращают инфекцию, блокируя прикрепление вируса гриппа к клеточной поверхности. Действие этих антител направлено, главным образом, на эпитопы первой иммунодоминантной высоковариабельной субъединицы гемагглютинаина (НА1). Узкая специфичность нейтрализующих антител делает существующие вакцины неэффективными против дрейфовых вариантов вируса гриппа и против вновь появляющихся вирусов с пандемическим потенциалом. Т-клеточный иммунитет вносит существенный вклад в очищение организма от вируса и обеспечивает легкое течение инфекции, поэтому для достижения более полного контроля над гриппозной инфекцией желательно иметь вакцины, индуцирующие не только гуморальный, но и Т-клеточный ответ. Разработка вакцин,

основанных на консервативных антигенах, которые усиливают как гуморальный, так и клеточный ответ, является универсальной стратегией контроля эпидемий и пандемий.

Гемагглютинин вируса гриппа – белок, синтезируемый в виде предшественника (НА0), который тримеризуется в эндоплазматическом ретикулуме и транспортируется на клеточную поверхность через аппарат Гольджи. Гемагглютинин (НА0) посттрансляционно разрезается хозяйскими протеазами на две субъединицы – НА1 и НА2, которые остаются связанными одним дисульфидным мостиком [1]. В отличие от НА1, вторая субъединица гемагглютинаина (НА2) относительно консервативна среди штаммов вируса и отвечает за слияние вирусной и клеточной мембраны в эндосомах, обеспечивая таким образом попадание рибонуклеинового комплекса в цитоплазму [2].

Иммунизация традиционными вакцинами и естественная гриппозная инфекция не приводят к образованию значительного количества анти-НА2-антител, что связано с низкой иммуногенностью стеблевого участка НА2 в присутствии иммунодоминантных рецепторсвязывающих регионов НА1 [3]. Однако в последнее время выделен ряд моноклональных антител (от мышей, человека), которые реагируют с эпитопами, локализованными в стеблевой части НА. Это перекрестно реагирующие антитела, которые нейтрализуют подтипы вируса гриппа в пределах филогенетической группы, обеспечивая, таким образом, широкий спектр защиты [4–11].

Моноклональные антитела, специфичные к регионам НА2 1–38 (CF2), 125–175 (FE1), способны ингибировать *in vitro* слияние вирусной и клеточной мембран. Внутривенное введение моноклональных антител CF2 и FE1 за 2 ч до заражения мышей Balb/c гомологичным и гетерологичным вирусами гриппа А/Н3N2 в дозе 1LD₅₀ обеспечивало 100% выживаемость опытных животных [6]. Моноклональное антитело CR6261, специфичное к гидрофобному карману стеблевой части НА2, ингибировало рН-индуцируемое конформационное изменение НА вирусов гриппа Н1N1, Н5N1 и обладало нейтрализующей активностью [4, 5]. Показано, что моноклональное антитело CR6261 взаимодействовало преимущественно с α-спиралью НА2, а также с соседними аминокислотными остатками НА2 и НА1. Большинство аминокислот в малой α-спирали НА2, которые взаимодействуют с CR6261, у подтипов вирусов гриппа первой филогенетической группы идентичны более чем на 99% (различия в 1–5 аминокислотных остатках). Моноклональное антитело CR6261 предотвращало конформационный переход НА при низких значениях рН, т.е. нейтрализовало вирус, стабилизируя нативное состояние НА и предотвращая рН-зависимое слияние вирусной и клеточной мембран. Выделено анти-Н3N2-моноклональное антитело 12D1, которое взаимодействовало с высококонсервативной большой α-спиралью НА2 (остатки 76–106), обладало нейтрализующей способностью и связывалось с вирусами гриппа подтипа Н3N2, циркулировавшими с 1968 по 2003 г. [8].

В последние годы разработан ряд кандидатных вакцин на основе НА2 вирусов гриппа А филогенетической группы II [12–14]. Показана их иммуногенность и эффективность в защите от заражения летальными дозами гомологичного и гетерологичного вирусов одной филогенетической группы. Предполагается, что конструирование антигена, формирующего иммунный ответ на консервативные эпитопы НА2, может служить основой для вакцины широкого спектра действия, обладаю-

щей профилактической и терапевтической эффективностью.

Целью данной работы было моделирование и создание гибридного рекомбинантного белка, содержащего перспективные Т- и В-клеточные эпитопы НА2 вирусов гриппа А/Н2N2, изучение его иммуногенности и протективного действия. В качестве основы гибридного белка выбран флагеллин – мукозальный адъювант, который усиливает иммунный ответ на присоединенные к нему антигены.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выбор консервативного участка НА2 вирусов гриппа А/Н2N2

Поиск аминокислотных последовательностей для анализа проводили в базе данных GenBank, построение выравниваний осуществляли с использованием программного обеспечения Vector NTI v10.0 (Invitrogen, США). Поиск вероятных Т-клеточных эпитопов осуществляли с использованием NetCTLpan1.1 Server [15] и параметров поиска, установленных по умолчанию. Поиск экспериментальных В- и CD4+ Т-клеточных эпитопов, гомологичных участкам НА2, проводили в базе данных Immune Epitope Database [16]. Визуализацию трехмерной структуры белков выполняли в программе Chimera 1.5.3 [17]. Для гомологичного моделирования трехмерной структуры белка по первичной последовательности использовали открытый веб-ресурс Phyre2 [18].

Конструирование экспрессионных векторов и создание штаммов-продуцентов *Escherichia coli*

Нуклеотидную последовательность, кодирующую гибридный рекомбинантный белок FlgМН, оптимизировали для экспрессии в *E. coli*, синтезировали и встраивали в вектор pQE30 по сайтам рестрикции BamHI и HindIII. Для создания белков Flg (флагеллин) и МН (фрагмент гемагглютинаина) соответствующие нуклеотидные последовательности амплифицировали с использованием праймеров, несущих концевые сайты рестрикции BamHI и HindIII, и затем встраивали в поликлональный сайт вектора pQE30. Для получения штаммов-продуцентов рекомбинантных белков плазмидами pQE30/FlgМН, pQE30/МН, pQE30/Flg трансформировали клетки *E. coli* DLT1270. Штамм DLT1270, производное штамма DH10B [19], содержит ген репрессора лактозного оперона *lacI*, интегрированный в хромосому.

Выделение и очистка рекомбинантных белков

Штаммы *E. coli* DLT1270, трансформированные векторами pQE30/FlgМН, pQE30/Flg и pQE30/МН, на-

капливали в среде LB с ампициллином, экспрессию индуцировали добавлением 1 мМ IPTG. Клетки обрабатывали лизоцимом, рекомбинантные белки очищали из клеточного лизата с помощью металлоаффинной хроматографии на Ni-сорбенте.

Электрофорез и иммуноблотинг

Электрофорез в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) проводили в денатурирующих условиях по методу Лэммли [20]. Пробы смешивали с буфером для внесения, 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. Мембрану инкубировали 1 ч при комнатной температуре с первичными антителами, разведенными в ФБР с 0.1% Твин 20 (ФБРТ) и 3% БСА, затем отмывали в ФБРТ. Флагеллин окрашивали кроличьими поликлональными антителами (Abscam, Великобритания) в разведении 1 : 16000. Для окрашивания фрагмента гемоглобина использовали кросс-специфичную сыворотку, полученную трехкратной последовательной иммунизацией мышей сублетальными дозами вирусов гриппа А филогенетической группы I (H2, H5 и H1pdm), в разведении 1 : 2000. Белки выявляли окрашиванием мембраны в течение 1 ч при комнатной температуре вторичными антителами, мечеными пероксидазой хрена (козьи антикроличьи IgG либо козьи антимышинные IgG, Invitrogen, США), в разведении 1 : 2000 и последующей инкубацией в течение 15 мин с субстратом ТМВ (тетраметилбензидин) Immunoblot solution (Invitrogen, США).

Иммунизация мышей

Иммуногенность рекомбинантного белка FlgMN исследовали на линейных мышцах Balb/c и C57Bl/6 (самки, возраст 6–8 недель, масса 18–20 г), полученных из питомника «Столбовая» ГУ научный центр биомедицинских технологий РАМН. Животных содержали в виварии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России в соответствии с действующими правилами. Мышей (16 особей) иммунизировали рекомбинантным белком FlgMN интраназально (после ингаляци-

онной анестезии 2–3% изофлюран, 30% O₂, 70% N₂O) трехкратно с двухнедельным интервалом в дозе 10 мкг/мышь в объеме 50 мкл. Контрольной группе мышей (16 особей) вводили рекомбинантный белок Flg интраназально трехкратно с двухнедельным интервалом в дозе 10 мкг/мышь.

Получение сывороток и БАЛ

Образцы крови получали от пяти мышей опытной и контрольной групп через 2 недели после последней 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 400g. Аликвоты сыворотки крови (по 30 мкл) замораживали при температуре –20°C.

Бронхоальвеолярные лаважи (БАЛ) получали от пяти мышей каждой группы через 2 недели после последней иммунизации после эвтаназии животных в CO₂-камере. Труп животного фиксировали на операционном столике брюшком кверху. Производили разрез кожи 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 400g, отбирали аликвоты надосадка и замораживали их при температуре –20°C.

Получение спленоцитов мыши

Спленоциты мыши получали в соответствии с протоколом BD Pharmingen™. На 14-й день после последней иммунизации мышей опытной и контрольной групп (по три мыши из каждой группы) подвергали эвтаназии с помощью CO₂-камеры. Селезенки мышей извлекали асептически, гомогенизировали с использованием Medimachine (BD Biosciences, США) и избавлялись от дебриса путем фильтрации через шприцевые фильтры с диаметром пор 70 мкм (Syringe filcons, BD Biosciences, США). Эритроциты лизировали АСК-буфером (0.15 М NH₄Cl, 1.0 М KHCO₃, 0.1 мМ Na₂EDTA, pH 7.2–7.4), спленоциты отмывали полной средой RPMI-1640 с 10% ЭТС, 2 мМ L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Жизнеспособность клеток оценивали окрашиванием 0.4% раствором трипанового синего. Концентрацию клеток доводили до 2 × 10⁶ кл./мл.

Синтетические пептиды

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

G-47 (24 аминокислоты): AADKESTQKAF-DGITNKVNSVIEK – малая α -спираль HA2 (35–58); G-48 (15 аминокислот): MNTQFEAVGKEFSNL – «расплетенный» в нативном неактивированном гемоглобине «линкерный» участок HA2 (59–72); G-49 (34 аминокислоты): ERRLLENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERT – часть большой α -спирали HA2 (73–107).

Иммуноферментный анализ

ИФА проводили общепринятым методом. 96-луночные планшеты с высокой сорбционной способностью (Greiner, Германия) покрывали рекомбинантным белком FlgMН в концентрации 5 мкг/мл или очищенными вирусами A/Singapore/1/57 (H2N2), A/PR/8/34 (H1N1), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Kurgan/05/2005/RG (H5N1) в концентрации 2 мкг/мл, сорбцию проводили в ФБР pH 7.2 в течение ночи при 4°C. После сорбции вирусов часть планшетов заливали на 30 мин цитратным буфером (pH 5.0), затем 1 раз отмывали ФБР. Планшеты обрабатывали блокирующим буфером (0.01 М ФБР, pH 7.2 с 5% ЭТС) в течение 1 ч при комнатной температуре, отмывали 3 раза ФБРТ. В лунки планшетов добавляли 100 мкл двукратных разведений сывороток (начиная с 1 : 400) в блокирующем буфере, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Использовали конъюгаты козьих поликлональных антимишьяных IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA (Abcam, Великобритания) с 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, которое дает оптическую плотность, по крайней мере, в 2 раза большую, чем среднее значение бланка.

Проточная цитометрия

Мультипараметрическую проточную цитометрию выполняли в соответствии с протоколом BD Pharmingen™. Определяли способность синтетических пептидов G-47, G-48, G-49 и вируса гриппа A/Singapore/1/57 (H2N2) активировать продукцию ИФН- γ специфическими CD8⁺ Т-лимфоцитами в селезенке. Спленоциты мышей Balb/c и C57Bl/6 получали на 14-й день после последней иммунизации, 2×10^6 спленоцитов мышей опытных и контрольных групп стимулировали (в течение 6 ч при 37°C) 10 мкг пептидов G-47, G-48, G-49 или 1 мкг вируса A/Singapore/1/57 (H2N2) в присутствии брэфелдина А (1 мкг/мл) (BD Bioscience, США). Клетки отмывали, Fc-рецепторы блокировали антителами

CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block, BD Pharmingen, США) и окрашивали флуоресцентно мечеными антителами анти-CD3a-FITC, анти-CD8-PerCP (BD Pharmingen, США) при 4°C в течение 30 мин. Затем клетки пермеабелизировали в соответствии с протоколом тест-системы Cytofix/Cytoperm Plus (BD Bioscience, США) и окрашивали флуоресцентно мечеными антителами анти-ИФН γ -PE (BD Pharmingen, США). Интенсивность флуоресценции измеряли на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Результаты анализировали с использованием программного обеспечения BD FACS Diva версия 6.1.3 (BD Bioscience, США).

Вирусы и заражение мышей

В работе использованы штаммы, полученные из Коллекции вирусов гриппа и ОРЗ лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России – A/Singapore/1/57 (H2N2), A/PR/8/34 (H1N1), A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/Kurgan/05/2005/RG (H5N1). В экспериментах с летальным заражением использовали адаптированный к репродукции в легких мышей вариант вируса гриппа A/Singapore/1/57 (H2N2), полученный в лаборатории гриппозных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. Вирусы накапливали в 10–12-дневных развивающихся куриных эмбрионах и очищали методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы.

Иммунизированных мышей (по 11 мышей в опытной и контрольной группах) заражали адаптированным к мышам вирусом гриппа A/Singapore/1/57 (H2N2) в дозе 2LD₅₀. Вирус вводили интраназально в объеме 50 мкл/мышь после ингаляционной анестезии (2–3% изофлюран, 30% O₂, 70% N₂O). После заражения проводили ежедневное наблюдение за животными. Протективное действие FlgMН оценивали по двум параметрам: динамика падения массы тела и выживаемость мышей после заражения.

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism v5.1. Статистическую значимость различий титров антител оценивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Сравнение показателей выживаемости проводили с использованием критерия Мантела–Кокса. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор и построение МН-фрагмента консенсусной последовательности HA2 вирусов гриппа A/H2N2

По результатам выравнивания консенсусных последовательностей HA2 найдены два протяженных

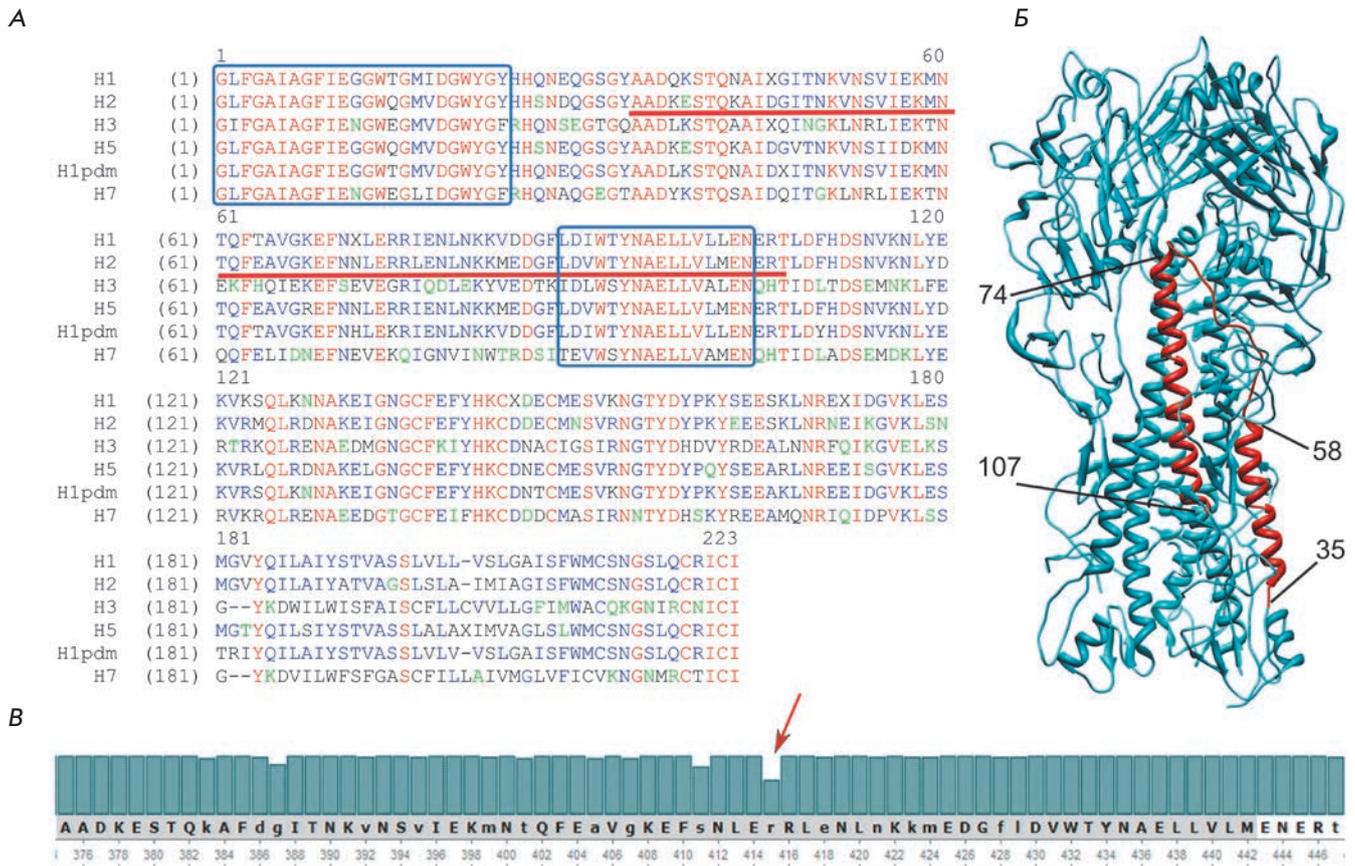


Рис. 1. А — выравнивание консенсусных последовательностей HA2 вирусов гриппа А различных подтипов. Два высококонсервативных участка с идентичностью последовательностей 78.3 и 62.5% соответственно выделены синими рамками. Подчеркнут фрагмент, выбранный для включения в состав гибридного белка. Б — трехмерная структура молекулы гемагглютинаина (тример, модель 3WR7 Protein Data Bank). Красным выделен фрагмент HA2 (35–107) одного из мономеров. Основные участки: малая α-спираль (35–58); неструктурная область (59–73); участок большой α-спирали, содержащий высококонсервативную область (74–107). В — степень консервативности аминокислот в участке HA2 (35–107) вирусов гриппа человека А/Н2N2 (нумерация по HA0). Наименее консервативный Arg416 (58.3%) отмечен красной стрелкой

высококонсервативных участка: (1–24) и (89–104) (рис. 1А). Идентичность на первом участке составляет 78.3%, однако он содержит высокогидрофобный пептид слияния HA, склонный к образованию агрегатов. Несмотря на то что консервативность второго участка меньше (62.5%), большинство аминокислотных замен не сопряжено с изменением физико-химических свойств боковых радикалов, что позволяет надеяться на небольшое изменение способности к презентации на определенных аллелях HLA. Кроме того, консервативная последовательность YNAELLVL, входящая в данный участок, обнаруживается в большой части В- и CD4+ Т-эпитопов в HA2 (рис. 2А). Наиболее отличаются от консенсуса последовательности H3 и H7 (филогенетическая группа II), при исключении которых идентичность

на участке повышается до 87.5%. Для конструирования целевого гибридного рекомбинантного белка был выбран фрагмент консенсусной последовательности HA2 вирусов гриппа человека А/Н2N2 (филогенетическая группа I).

В состав гибридного белка была включена консервативная область HA2 (89–104), а также малая α-спираль HA2 (35–58), выступающая на поверхность тримера, и потенциально доступная для связывания антителами (рис. 1Б). Для сохранения третичной структуры в состав гибридного белка FlgMN включен непрерывный фрагмент HA2 (35–107).

Фрагмент HA2 (35–107) вирусов гриппа H2 человека обладает наибольшей однородностью по аминокислотному составу. Наиболее вариабельной аминокислотой (встречаемость 58.3%) является аргинин

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

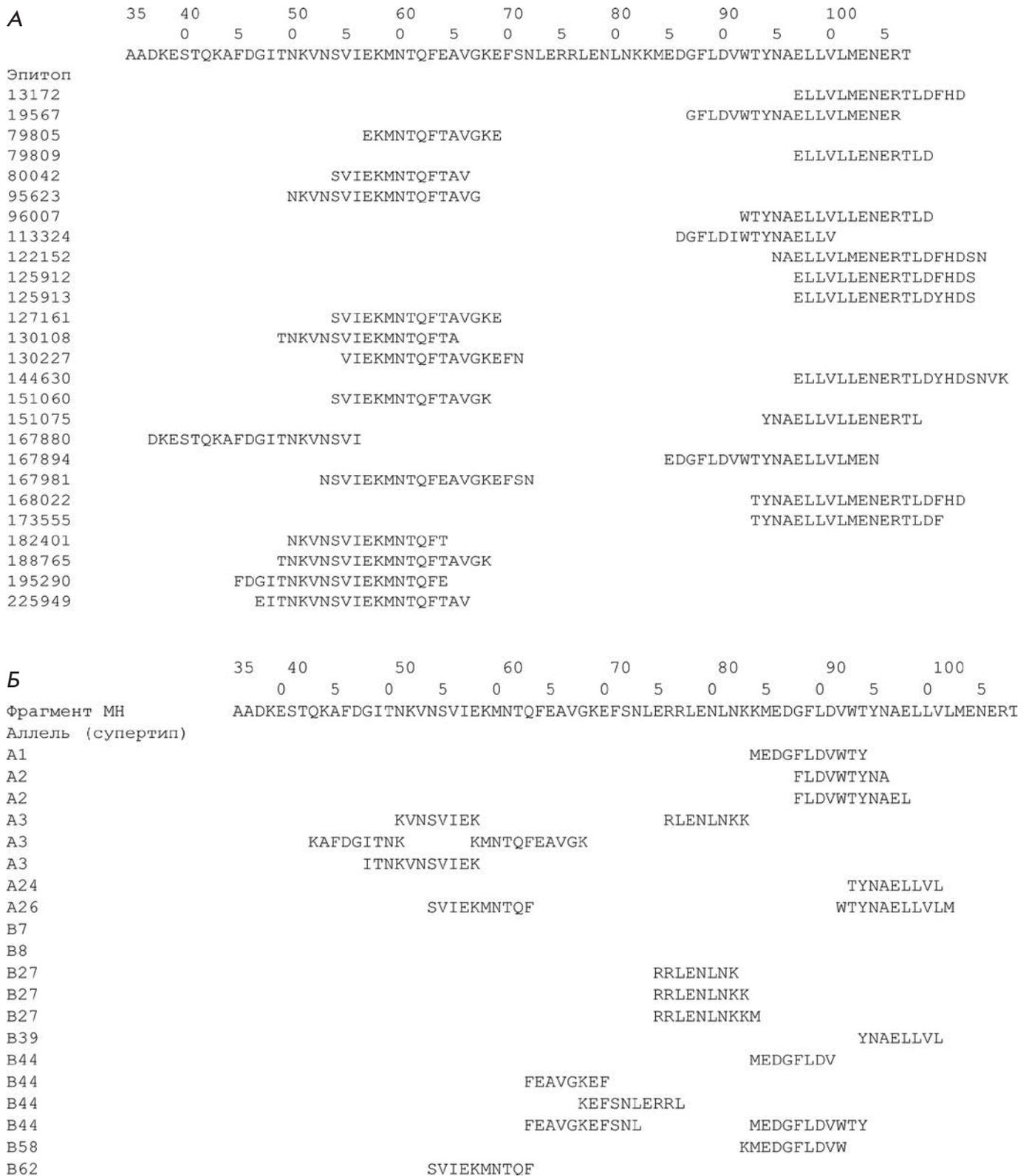


Рис. 2. А – экспериментальные В- и CD4+ Т-клеточные эпитопы, гомологичные фрагменту консенсусной последовательности H2 HA2 (35–107) не менее чем на 90%, результат поиска по базе данных IEDB. Б – потенциальные CD8+ Т-клеточные эпитопы в составе фрагмента HA2 (35–107) для репрезентативного набора аллелей HLA, результат анализа с использованием NetCTLpan1.1 Server [19]

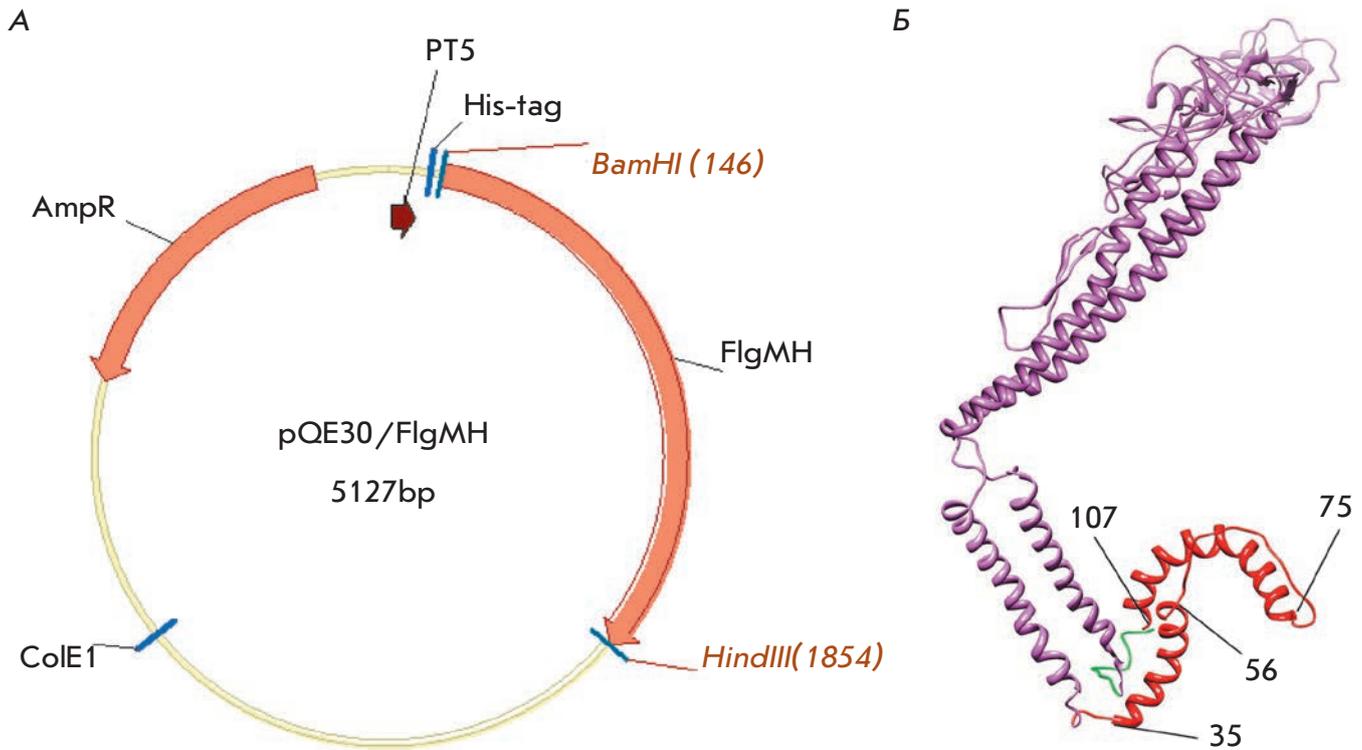


Рис. 3. А – карта плазмиды, кодирующей белок FlgMN. BamHI, HindIII – сайты клонирования гена, кодирующего белок FlgMN в поликлональный сайт вектора pQE30. ColE1 – участок начала репликации, PT5 – T5 промотор, AmpR – ген β-лактамазы, маркер устойчивости к ампициллину, His-tag – N-концевой гистидиновый таг. Б – теоретическая модель трехмерной структуры мономера гибридного белка FlgMN: красным выделен фрагмент HA2 (35–107), фиолетовым – флагеллин, зеленым – гистидиновый таг

(R) в положении 75 (позиция 415 в нумерации HA0), при этом в 41.7% в данном положении находится лизин (K). Обе аминокислоты положительно заряжены, боковой радикал аргинина крупнее и, следовательно, предпочтительнее для провокации гуморального иммунного ответа (рис. 1B).

Кроме того, последовательность HA2 (35–107) содержит участки, гомологичные экспериментальным B- и CD4⁺ T-клеточным эпитопам, представленным в базе данных IEDB (рис. 2A). Теоретический поиск показал наличие множественных потенциальных CD8⁺ T-клеточных эпитопов в составе фрагмента HA2 (35–107) для репрезентативного набора аллелей (рис. 2B).

Дизайн гибридного рекомбинантного белка FlgMN

Химерный белок конструировали с использованием коммерческой плазмиды pQE30, содержащей перед сайтом клонирования старт-кодон и гистидиновый таг. Гибридный белок FlgMN включал полную размерную последовательность флагеллина (FlgC) без старт-кодона и целевую последовательность MN,

кодируемые одной рамкой считывания с гистидиновым тагом (рис. 3A). Таким образом, рекомбинантный белок FlgMN состоял из флагеллина, к N-концу которого присоединен гистидиновый таг, а к C-концу – участок (35–107) консенсусной последовательности HA2 вирусов гриппа человека A/H2N2. Гомологичное моделирование трехмерной структуры FlgMN показало сохранение α-спирализации в участках MN, соответствующих фрагментам (38–56) и (75–107) в составе HA2 (рис. 3B), из чего можно предположить, что большая часть нативной структуры сохранена, и гибридный белок будет стимулировать образование антител, в том числе к структурным эпитопам, характерным для нативного HA.

Получение и очистка рекомбинантных белков

Нуклеотидные последовательности, кодирующие гибридный белок FlgMN, а также его компоненты Flg и MN были клонированы в вектор pQE30 и экспрессированы в штамме *E. coli* DLT1270 (рис. 4A). Теоретическая молекулярная масса белков составляла соответственно FlgMN – 61.3, Flg – 52.9,

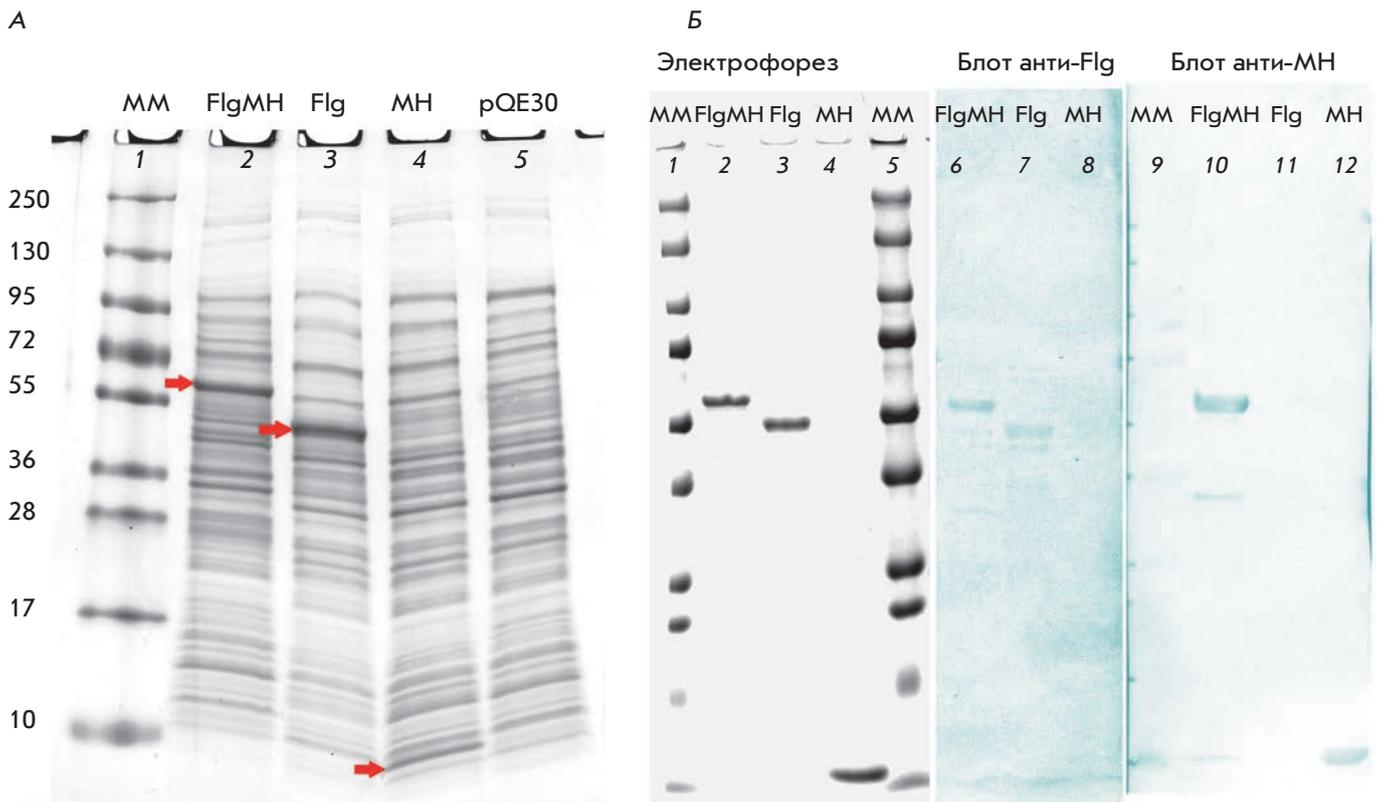


Рис. 4. А – экспрессия рекомбинантных белков в клетках *E. coli*. 1 – набор белковых стандартов (Fermentas, ЕС), обозначен в кДа; 2–4 – лизат клеток, трансформированных плазмидой рQE30 с соответствующей вставкой; 5 – лизат клеток, трансформированных вектором рQE30 без вставки. Полосы, соответствующие рекомбинантным белкам, обозначены стрелками. Б – рекомбинантные белки FlgМН, Flg и МН после хроматографической очистки на Ni-сорбенте. Представлен результат электрофореза, а также Вестерн-блот с использованием поликлональных антител к флагеллину (6–8) и антисыворотки к фрагменту МН (9–12)

МН – 9.8 кДа, что совпадало с их электрофоретической подвижностью в ПААГ (рис. 4Б). Белки FlgМН и Flg были хорошо растворимы в ФБР, в отличие от белка МН, который накапливался в тельцах включения и растворялся только в 2 М мочеvine. Очищенные белки FlgМН и Flg взаимодействовали в Вестерн-блоттинге с кроличьей поликлональной сывороткой к флагеллину, а белки FlgМН и МН – с мышинной кросс-специфичной сывороткой против НА вирусов гриппа филогенетической группы I (рис. 4Б).

Иммуногенность и протективность рекомбинантного белка FlgМН

Консенсусная последовательность НА2 (35–107), входящая в состав белка FlgМН, включает в себя В-, CD4+ и CD8+ Т-клеточные эпитопы, поэтому мы оценивали способность рекомбинантного белка FlgМН стимулировать как В-, так и Т-клеточный иммунный ответ.

Для исследования способности рекомбинантного белка FlgМН индуцировать образование НА2-специфических антител мышей Balb/c иммунизировали трехкратно интраназально белком FlgМН без адъюванта, контрольной группе мышей вводили белок Flg. Интраназальный путь введения антигена индуцирует формирование как системного, так и местного иммунного ответа. Поэтому на 14-е сутки после последней иммунизации мы определяли содержание IgA в сыворотке и БАЛ к целевому антигену, а также титры антител в сыворотке к вирусам гриппа первой и второй филогенетических групп, а также оценивали профиль подклассов IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3). Местный ответ обусловлен секреторным sIgA, мультимерная форма которого обладает эффективной противовирусной активностью, блокируя вирусную репликацию [21, 22]. Интраназальная иммунизация мышей рекомбинантным белком FlgМН стимулировала формирование

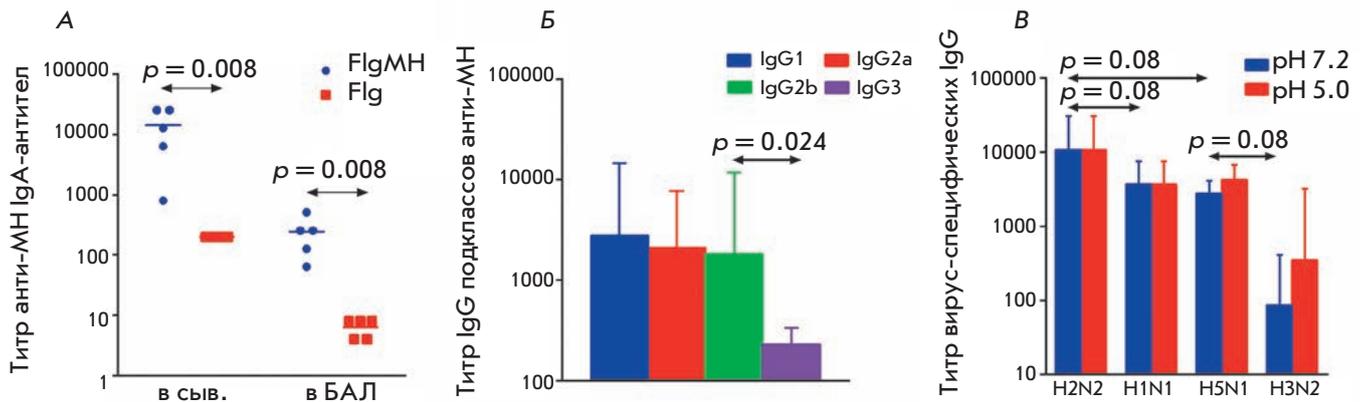


Рис. 5. Титры антител у мышей опытной и контрольной групп через 2 недели после трехкратной иммунизации. А – титры IgA-антител в сыворотке и БАЛ к целевому антигену МН. Б – СГТ подклассов IgG к целевому антигену МН у мышей опытной группы. В – СГТ IgG-антител в сыворотке к вирусам гриппа А/PR/8/34 (H1N1), А/Singapore/1/57 (H2N2), А/Aichi/2/68 (H3N2), А/Kurgan/05/2005 (H5N1). Для расчета значения p использован критерий Манна–Уитни

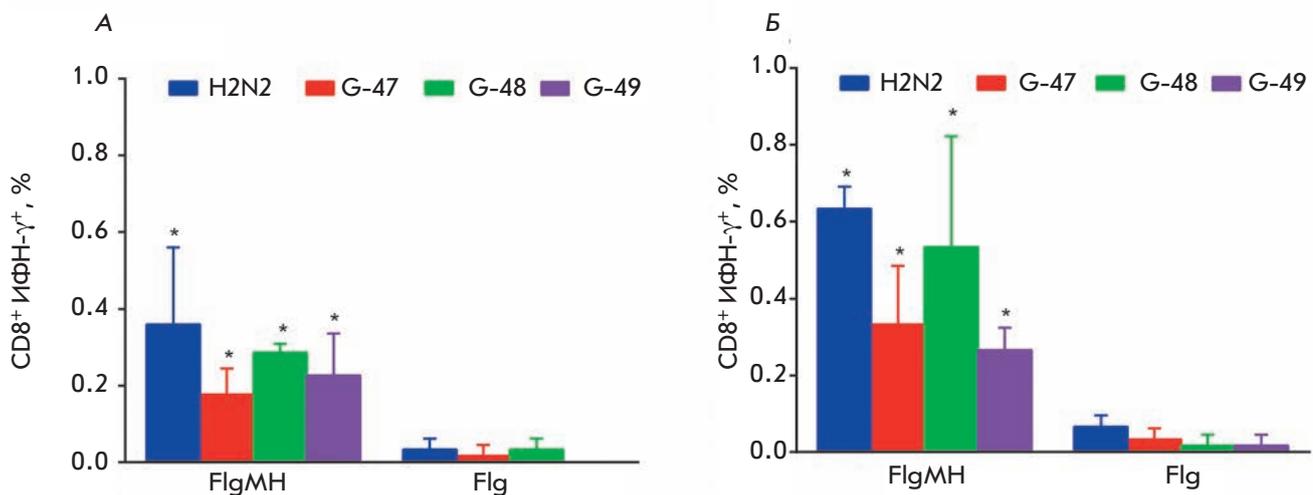


Рис. 6. Синтез ИФН- γ CD8+ Т-клетками селезенки мышей после рестимуляции пептидами G-47, G-48, G-49 и вирусом гриппа А/Singapore/1/57 (H2N2) у мышей C57Bl/6 (А) и Balb/c (Б). Селезенки забирали у трех мышей опытной и контрольной групп через 14 дней после трехкратной иммунизации. * – отличие от контроля $p < 0.05$ (критерий Манна–Уитни)

высокого уровня анти-НА2 IgA в сыворотке и БАЛ иммунизированных животных (рис. 5А).

Известно, что тип иммунного ответа на флагеллин и рекомбинантные белки на его основе определяется формой флагеллина. Растворимый флагеллин (мономерный и полимерный) индуцирует иммунный ответ, специфичный к флагеллину и введенному с ним целевому антигену с сильным преобладанием ответа Th2-типа [23–29]. Тогда как закрепленная в мембра-

не форма флагеллина вызывает преимущественно иммунный ответ Th1-типа [24, 28]. С другой стороны, показано, что тип иммунного ответа на целевой антиген зависит также от антигена, слитого с флагеллином [23]. Как показано на рис. 5Б, иммунизация растворимым рекомбинантным белком FlgMН приводила к индукции практически одинакового уровня IgG1 (тип ответа Th2), IgG2a и IgG2b (тип ответа Th1) НА2-специфических антител: IgG1 – 40.0%,

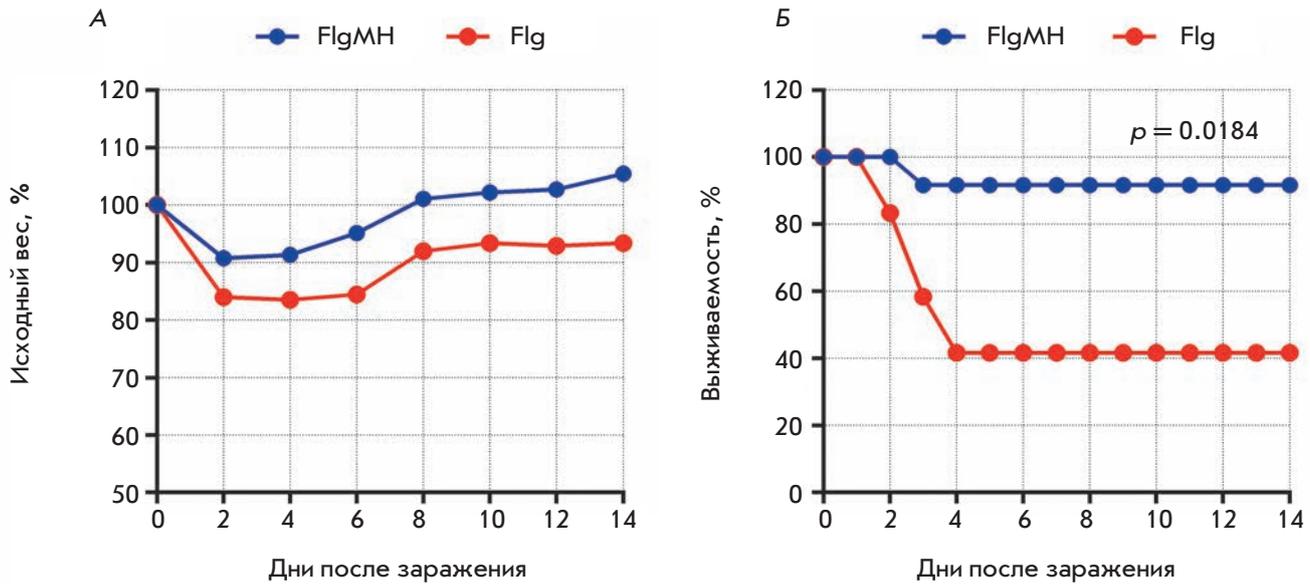


Рис. 7. Изменение среднего веса (А) и кривая выживаемости Каплана–Мейера (Б) в группах иммунизированных мышей после заражения адаптированным вирусом гриппа А/Singapore/1/57 (H2N2) в дозе 2LD₅₀. Мышей вакцинировали гибридным белком FlgMH или белком-носителем Flg, затем заражали летальным вирусом. За состоянием животных следили в течение 14 дней. Для расчета значения *p* использован критерий Мантела–Кокса

IgG2a – 30.3%, IgG2b – 26.4%, IgG3 – 3.3%. Отсутствие существенных различий подклассов IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b) к целевому антигену после иммунизации мышей рекомбинантным белком FlgMH предполагает формирование смешанного Th1 и Th2 иммунного ответа.

Выбранная консенсусная последовательность HA2 (35–107) достаточно консервативна у вирусов гриппа первой филогенетической группы (87.5% гомологии), поэтому представлялось важным оценить формирование кросс-реактивных антител после иммунизации мышей белком FlgMH. По результатам ИФА HA2-специфические IgG, индуцируемые рекомбинантным белком FlgMH, связывались не только с вирусом гриппа субтипа А/Н2N2 (среднегеометрический титр, СГТ = 12800), но и с другими подтипами вируса гриппа А первой филогенетической группы: Н1 (СГТ = 4160) и Н5 (СГТ = 2880) (рис. 5В). Однако титры антител к вирусам гриппа подтипов Н1 и Н5 были значимо ниже, чем к подтипу Н2 (*p* < 0.05, критерий Манна–Уитни). Кроме того, индуцируемые антитела связывались с гемагглютинином в нативной конформации (рН 7.2) и с кислой формой гемагглютинина (рН 5.0) с одинаковой интенсивностью (рис. 5В), что свидетельствует о доступности целевой последовательности HA2 на поверхности вириона для антител.

Способность рекомбинантного белка FlgMH индуцировать клеточный ответ определяли по про-

дукции ИФН- γ CD3+CD8+ Т-лимфоцитами селезенки после рестимуляции синтетическими пептидами (G-47, G-48, G-49), соответствующими целевой последовательности HA2 и очищенным вирусом гриппа А/Н2N2. Показано, что число активированных ИФН- γ секретирующих CD3+CD8+ Т-клеток как у мышей линии Balb/c (гаплотип H-2d), так и у мышей линии C57Bl/6 (гаплотип H-2b), иммунизированных рекомбинантным белком FlgMH, было статистически значимо выше (*p* < 0.05, критерий Манна–Уитни), чем у мышей, иммунизированных белком-носителем флагеллином (рис. 6А,Б).

Флагеллин обеспечивает антигенспецифический CD4+ Т-клеточный ответ [30] через активацию TLR5, экспрессируемых на клетках CD11c+ [31], что приводит к сильному гуморальному ответу. Однако способность флагеллина стимулировать специфический CD8+ Т-клеточный ответ остается неясной. В ряде работ показано, что иммунизация мышей слитым белком (флагеллин-GFP, флагеллин-OVA) стимулирует CD8+ ответ на антиген, в отличие от иммунизации только антигеном без флагеллина [26, 32]. С другой стороны, установлено, что растворимый флагеллин, слитый с антигеном, преимущественно индуцирует Th2-ответ и не формирует антигенспецифических клеток CD8+ [23–36]. Для презентации в МНС-комплексе экзогенный антиген подвергается протеолитическому расщеплению, перед которым он должен быть развернут [33]. Восстановление дис-

ульфидных связей внутри белка является ключевым моментом в процессе разворачивания [34], и кросс-презентация дендритными клетками антигена, содержащего дисульфидные мостики, зависит от экспрессии тиоловых редуктаз, индуцируемой ИФН- γ [35]. Показано [36], что слияние МНС I ограниченных иммуногенных эпитопов с флагеллином может создать псевдоадъювантный эффект, который функционирует через усиление презентации антигена на поверхности клетки и не зависит от TLR5, MyD88 и консервативных регионов флагеллина. Это обусловлено более эффективным процессингом антигена, слитого с флагеллином, чем антигена в нативном состоянии, т.е. антиген, а не сигнал TLR5 является лимитирующим фактором при формировании CD8⁺ Т-клеточного ответа. Таким образом, флагеллин может быть платформой для вакцин, которые содержат слабопроцессирующиеся антигены, несущие CD8⁺ эпитопы [36].

Нами установлено, что растворимая форма флагеллина, слитого с последовательностью HA₂³⁵⁻¹⁰⁷, содержащей CD8⁺ эпитопы, стимулирует формирование HA2-специфических CD8⁺ Т-клеток.

Способность рекомбинантного белка FlgMN защищать мышей показана при заражении иммунизированных животных летальной дозой (2LD₅₀) адаптированного вируса гриппа A/Singapore/1/57 (H2N2). Иммунизация приводила к различию в динамике массы тела опытных и контрольных мышей, у иммунизированных мышей максимальная потеря массы тела составила 10%, у контрольных – 16.6% (рис. 7А). Иммунизация рекомбинантным белком FlgMN защищала мышей от заражения (рис. 7Б). Выживаемость в опытной группе составила 91.0%, в отличие от контрольной группы – 41%. Полученные различия были статистически значимыми ($p = 0.0184$, критерий Мантела–Кокса).

ВЫВОДЫ

Консервативные участки второй субъединицы HA представляют интерес для дизайна вакцинных кон-

струкций, способных обеспечить иммунитет широкого спектра действия против вирусов гриппа А. Гибридный рекомбинантный белок FlgMN на основе флагеллина и высококонсервативного фрагмента гемагглютинаина HA2 (35–107) вирусов гриппа подтипа А/Н2N2 содержит потенциальные В-клеточные, а также CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные эпитопы и сочетает адъювантную активность флагеллина, обусловленную его специфическим связыванием с TLR5, и консервативность участка стеблевой части молекулы гемагглютинаина, которая участвует в конформационных изменениях, ведущих к слиянию бислойных липидных мембран вируса и клетки-хозяина в процессе рН-индуцированной реакции слияния. Целевая последовательность, включающая малую α -спираль, фрагмент большой α -спирали и соединяющий их участок, входит в состав второй цепи гемагглютинаина и отличается очень высокой стабильностью аминокислотного состава в рамках подтипа.

Рекомбинантный белок FlgMN стимулирует формирование смешанного Th1/Th2-ответа на целевую последовательность, а также кросс-реагирующих антител, связывающихся с вирусами гриппа первой филогенетической группы (H1, H2, H5), и индукцию специфических цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+ИФН- γ +). Иммунизация слитым белком защищала иммунизированных животных от летальной гриппозной инфекции. Сконструированный гибридный рекомбинантный белок FlgMN является перспективной основой для создания противогриппозной вакцины широкого спектра действия, способной стимулировать Т- и В-клеточный иммунный ответ. Кросс-протективный потенциал фрагментов HA2 может быть усилен оптимизацией их доставки и увеличением иммуногенности при помощи лигандов TLR-рецепторов для эффективной стимуляции врожденного иммунитета и последующего усиления адаптивного иммунного ответа. ●

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skehel J.J., Wiley D.C. // Annu. Rev. Biochem. 2000. V. 69. P. 531–569.
2. Gerhard W., Mozdzanowska K., Zharikova D. // Emerg. Infect. Dis. 2006. V. 12. № 14. P. 569–574.
3. Kwong P.D., Wilson I.A. // Nat. Immunol. 2009. V. 10. № 6. P. 573–578.
4. 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.
5. 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.
6. Gocnik M., Fislova T., Sladkova T., Mucha V., Kostolansky F., Vareckova E. // J. Gen. Virol. 2007. V. 88. № 3. P. 951–955.
7. Prabhu N., Prabakaran M., Ho H.T., Velumani S., Qiang J., Goutama M., Kwang J. // J. Virol. 2009. V. 83. № 6. P. 2553–2562.
8. Wang T.T., Tan G.S., Hai R., Pica N., Petersen E., Moran T.M., Palese P. // PLoS Pathog. 2010. V. 6. № 2. P. e1000796.
9. 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.
10. Corti D., Voss J., Gamblin 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.

11. Wrammert J., Koutsonanos 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.
12. 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.* 2010. V. 107. № 44. P. 18979–18994.
13. 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.
14. Stanekova Z., Adkins I., Kosova M., Janulíková J., Sebo P., Vareckova E. // *Antiviral Res.* 2013. V. 97. № 1. P. 24–35.
15. Stranzl T., Larsen M.V., Lundegaard C., Nielsen M. // *Immunogenetics.* 2010. V. 62. № 6. P. 357–368.
16. Vita R., Zarebski L., Greenbaum J.A., Emami H., Hoof I., Salimi N., Damle R., Sette A., Peters B. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. Database issue. P. D854–D862.
17. 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.
18. Kelley L.A., Sternberg M.J. // *Nat. Protoc.* 2009. V. 4. № 3. P. 363–371.
19. Grant S., Jessee J., Bloom F., Hanahan D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. № 12. P. 4645–4649.
20. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
21. Arulanandam B.P., Raeder R.H., Nedrud J.G., Bucher D.G., Le J., Metzger D.W. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. № 1. P. 226–231.
22. Bizanov G., Janakova L., Knapstad S.E., Karlstad T., Bakke H., Haugen I.L., Haugan A., Samdal H.H., Haneberg B. // *Scand. J. Immunol.* 2005. V. 61. № 6. P. 503–510.
23. Bobat S., Flores-Langarica A., Hitchcock J., Marshall J.L., Kingsley R.A., Goodall M., Gil-Cruz C., Serre K., Leyton D.L., Letran S.E. // *Eur. J. Immunol.* 2011. V. 41. № 6. P. 1606–1618.
24. Cunningham A.F., Khan M., Ball J., Toellner K.M., Serre K., Mohr E., MacLennan I.C. // *Eur. J. Immunol.* 2004. V. 34. № 11. P. 2986–2995.
25. Didierlaurent A., Ferrero I., Otten L.A., Dubois B., Reinhardt M., Carlsen H., Blomhoff R., Akira S., Kraehenbuhl J.P., Sirard J.C. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. № 11. P. 6922–6930.
26. Huleatt J.W., Jacobs A.R., Tang J., Desai P., Kopp E.B., Huang Y., Song L., Nakaar V., Powell T.J. // *Vaccine.* 2007. V. 25. № 4. P. 763–775.
27. Sanders C.J., Franchi L., Yarovinsky F., Uematsu S., Akira S., Nunez G., Gewirtz A.T. // *Eur. J. Immunol.* 2009. V. 39. № 2. P. 359–371.
28. Gat O., Galen J.E., Tennant S., Simon R., Blackwelder W.C., Silverman D.J., Pasetti M.F., Levine M.M. // *PLoS One.* 2011. V. 5. № 11. P. e1373.
29. 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.
30. McSorley S.J., Ehst B.D., Yu Y., Gewirtz A.T. // *J. Immunol.* 2002. V. 169. № 7. P. 3914–3919.
31. Bates J.T., Uematsu S., Akira S., Mizel S.D. // *J. Immunol.* 2009. V. 182. № 12. P. 7539–7547.
32. Cuadros C., Lopez-Hernandez F.J., Dominguez A.L., McClelland M., Lustgarten J. // *Infect. Immun.* 2004. V. 72. № 5. P. 2810–2816.
33. Jensen P.E. // *Semin. Immunol.* 1995. V. 7. № 6. P. 347–353.
34. Collins D.S., Unanue E.R., Harding C.V. // *J. Immunol.* 1991. V. 147. № 12. P. 4054–4059.
35. Singh R., Cresswell P. // *Science.* 2010. V. 328. № 5984. P. 1394–1398.
36. Bates J.T., Graff A.H., Phipps J.P., Grayson J.M., Mizel S.B. // *J. Immunol.* 2011. V. 186. № 11. P. 6255–6262.