

Веремейко Татьяна Александровна

**ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ВАКЦИН ПРОТИВ
ГЕПАТИТА В НА ОСНОВЕ HBsAg**

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в ФГУП Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» МЗСР РФ.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук Карпенко Л.И.

Официальные оппоненты:

кандидат биологических наук Бажан С.И.

доктор биологических наук Беклемишев А.Б.

Ведущая организация:

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Защита состоится « 29 » декабря 2005 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д.208.020.01 при ФГУП Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» МЗСР РФ по адресу: ФГУП ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово Новосибирской области, 630559, тел.(383)336-74-28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП ГНЦ ВБ «Вектор».

Автореферат разослан « 28 » ноября 2005 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Малыгин Э.Г.

2006-4
29969

2264037

Общая характеристика работы

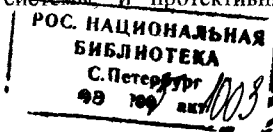
Актуальность проблемы. Гепатит В (ГВ) является одной из наиболее социально значимых инфекций. По данным ВОЗ 30% населения мира, больны, инфицированы или перенесли заболевание гепатитом В. Ежегодно в мире от инфекции вируса гепатита В (HBV) умирает около 750 тыс. человек. Опасность и широкая распространенность гепатита В также связаны с тем, что из общего числа первично инфицированных гепатитом В 2-10% заболевших становятся хроническими носителями HBV - инфекции. Около 350 млн. человек в мире находятся в состоянии хронического вирусоносительства и являются резервуаром инфекции.

Один из путей решения проблемы – применение вакцин. В настоящее время в медицинской практике применяются вакцины против гепатита В, основным компонентом которых является дрожжевой рекомбинантный HBsAg. Применение этих препаратов позволяет значительно снизить заболеваемость гепатитом В.

Тем не менее, дрожжевая вакцина, применяемая сегодня, имеет ряд недостатков. Это низкая иммуногенность вакцины, трехкратная вакцинация для достижения длительного протективного ответа. Кроме того, существует категория людей, у которых вообще не развивается сероконверсия. Другим недостатком является то, что инъекционная форма вакцины не стимулирует мукозальный иммунный ответ и не обеспечивает резистентность во входных воротах инфекции. В то же время доля непарентерального пути передачи вируса в последние годы значительно увеличивается. Стоит отметить и то, что клеточный ответ иммунной системы при вирусной инфекции возникает в основном на коровий белок вируса (HBcAg), и его уровень имеет существенное значение на исход заболевания. Применение активной иммунизации HBcAg в терапевтических целях может уменьшить риск развития хронической инфекции.

Таким образом, несмотря на эффективность дрожжевой вакцины, необходимость в разработке новых вакцин против ГВ, превосходящих или дополняющих используемую в настоящее время, не вызывает сомнений.

Известно, что протективными свойствами обладают районы preS поверхностного белка HBV. Таким образом, было бы перспективно объединение HBcAg, мощного стимулятора иммунной системы, и протективных свойств



районов preS поверхностного белка для создания более эффективной вакцины против вируса гепатита В.

Для разработки вакцин, стимулирующих мукозальный иммунный ответ, интересным представляется создание вакцин на основе живых аттенуированных штаммов сальмонелл, продуцирующих чужеродные антигены. Сальмонеллы обладают способностью проникать через эпителий слизистой, преимущественно через М-клетки и размножаться в локальных интраинтестинальных лимфоидных образованиях и парентеральной лимфоидной ткани, стимулируя как системный так и мукозальный иммунный ответ.

Так как клеточный иммунный ответ играет значительную роль в элиминации вируса из организма необходимо, чтобы вакцина против ГВ обеспечивала усиление именно этого звена иммунитета. Одним из таких подходов может быть ДНК вакцинация.

Цель работы. Получение и исследование иммуногенных свойств химерных частиц HBsAg, несущих протективные эпитопы поверхностного белка HBV; получение конструкций, обеспечивающих мукозальный иммунный ответ, и получение ДНК-вакцины, обеспечивающей клеточный иммунный ответ к HBsAg.

Научная новизна и практическая ценность работы. В данной работе были получены химерные частицы HBsAg, несущие эпитопы районов preS1 и preS2 поверхностного белка HBV. Были исследованы иммуногенные свойства полученных химерных частиц HBsAg. Было показано, что иммунизация химерными частицами HBsAg индуцирует синтез антигел, специфичных встроеным эпитопам районов preS1 и preS2. Химерные частицы HBsAg сохраняют способность эффективно стимулировать Т-клеточное звено иммунитета.

Применение математических методов впервые позволило разработать рекомендации для внедрения встроок в основную антигенную детерминанту HBsAg без нарушения его способности к самосборке для использования HBsAg в качестве универсального носителя эпитопов.

Получен аттенуированный штамм *Salmonella enteritidis*, продуцирующий HBsAg. Показано, что штамм *Salmonella enteritidis*, продуцирующий HBsAg при ректальной иммунизации, способен стимулировать как системный так и мукозальный гуморальный иммунный ответ.

Получена ДНК-вакцина, содержащая ген HBsAg. Было показано, что иммунизация ДНК-вакциной стимулирует клеточный иммунный ответ T_H1 типа к HBsAg.

Сконструированные химерные антигены, ДНК вакцина, содержащая ген HBsAg и аттенуированный штамм сальмонелл, продуцирующий HBsAg могут быть использованы в качестве компонентов вакцины против ГВ. Полученные данные могут быть основой разработки рациональных способов иммунопрофилактики вируса гепатита В.

Апробация работы и публикации. Материалы исследований по теме диссертации были представлены на следующих российских и международных конференциях: "Fifth John Humphrey advanced summer program in immunology", 2000, Pushino, Russia; 9-я международная конференция "СПИД, рак и родственные проблемы", 2001г., С-Петербург, Россия; "Sixth John Humphrey advanced summer programme in immunology", 2002, Pushino, Russia; "Bacterial virulence and survival course", 2002, Greece; "Актуальные вопросы разработки, производства и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов", 2004г., Томск, Россия; "13th International symposium on HIV and emerging infectious diseases", 2004, France; "First Russian-German workshop on infection and immunity – tools and strategies for novel vaccines", 2005, Germany; "New approaches to vaccine development, 2005, Germany;

По материалам диссертации опубликовано 5 статей и оформлен патент.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из 7 разделов: "Введение", "Обзор литературы", "Материалы и методы", "Результаты и обсуждение", "Заключение", "Выводы" и "Список литературы". Работа изложена на 111 страницах машинописного текста и включает 25 рисунков, 2 таблицы, и список литературы, содержащий 206 ссылок.

Основное содержание работы

1. Конструирование химерных HBsAg

Ранее в нашей лаборатории была сконструирована плазмида рКHBs-HBs, обеспечивающая синтез гибридного корового белка HBs-HBs, несущего основную антигенную детерминанту поверхностного белка HBV в иммунодоминантном районе HBs белка, между 81 и 82 а.о. (Карпенко и др., 2000). Однако, как было

отмечено выше, для создания протективного иммунного ответа необходимо присутствие в вакцине нескольких эпитопов вирусных белков, антитела к которым обладали бы вирус-нейтрализующими свойствами.

Задачей первого этапа данной работы являлось конструирование химерных белков HBc, несущих эпитопы иммуноактивного района preS.

На основании литературных данных по картированию района preS и исследованию протективных свойств фрагментов этого района поверхностного белка были выбраны наиболее иммуногенные эпитопы для встройки в HBcAg. Это фрагменты района preS1 серотипа ауw (27-37 а.о.) и района preS2 (131-145 а.о.):

27	37	131	145
DNQLDPAFRAN		LQDPRVRGLYFPAGG	

Для работы была использована плазмида pKHBc, сконструированная ранее, данная плазмида несет ген HBcAg под контролем tac промотора (Карпенко и др., 1997).

Встройку химически синтезированных фрагментов ДНК, кодирующих эпитопы preS, в состав гена С проводили с помощью стандартных методик. Олигонуклеотиды встраивали в район гена HBc белка, соответствующий иммунодоминантному району этого белка. Структуры полученных рекомбинантных плазмид были подтверждены рестрикционным анализом и секвенированием района встройки. Полученными плазмидами трансформированы клетки *Escherichia coli* DH5 α F'(recA). Продукцию химерных белков HBcAg оценивали с помощью электрофореза в 15% акриламидном геле. Было показано, что продукция химерного белка в полученных штаммах-продуцентах невелика – не более 1 % от суммарного клеточного белка. Для увеличения продукции химерных белков было решено использовать высококопийную экспрессирующую плазмиду pUC8. Продукция химерных белков в штаммах DH5 α F', несущих плазмиды pUC8HBc-preS1, pUC8HBc-preS2 и pUC8HBc-HBs составила 5-10% от суммарного клеточного белка. На рис.1 представлен электрофорез лизатов клеток полученных штаммов и иммуноблоттинг с МКА к N-концу молекулы HBcAg.

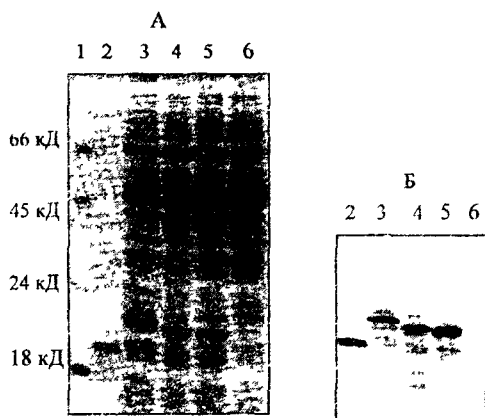


Рис.1 А - Электрофорез лизатов клеток *E. coli* в 15% ПААГ. Б - Иммуноблоттинг белков после разделения в 15% ПААГ с моноклональными антителами к N- концы белка HBc. На дорожках:

- 1 - маркер молекулярной массы (18, 24, 45 и 66 кД);
- 2 - очищенный HBcAg;
- 3 - лизат клеток *E. coli*, продуцирующих белок HBc-preS1;
- 4 - лизат клеток *E. coli*, продуцирующих белок HBc-preS2;
- 5 - лизат клеток *E. coli*, продуцирующих белок HBc-HBs;
- 6 - лизат клеток *E. coli*

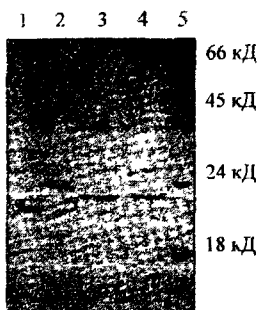


Рис.2 Электрофорез очищенных химерных коровых белков в 15% ПААГ. На дорожках

- 1 - очищенный белок HBcAg;
- 2 - очищенный белок HBc-preS1;
- 3 - очищенный белок HBc-HBs;
- 4 - очищенный белок HBc-preS2;
- 5 - маркер молекулярной массы (18, 24, 45 и 66 кД).

Анализ фракций биомассы клеток *E. coli*, содержащих плазмиду рUC8HBc-preS1 или рUC8HBc-HBs, показал, что химерные коровые белки HBc-preS1 и HBc-HBs обнаруживаются как в растворимой, так и в нерастворимой фракциях биомассы (дебрисе), примерно в равных пропорциях. Блок HBc-preS2 находится только в нерастворимой фракции биомассы бактериальных клеток. Выделение белков

осуществляли методами аффинной хроматографии и центрифугированием в градиенте сахарозы.

Очищенные белки анализировали с помощью электрофореза в 15% ПААГ (рис.2).

Для анализа организации молекул химерных белков препараты исследовали с помощью электронной микроскопии. Было обнаружено, что белки HBc-HBs и HBc-preS1 собираются в частицы, по размеру и морфологии подобные нативному HBcAg (рис.3А,Б,В). Белок HBc-preS2,

выделенный из клеточного дебриса, формировал большие частицы неправильной формы, превышающие размерами нативные частицы в несколько раз (рис.3 Г).

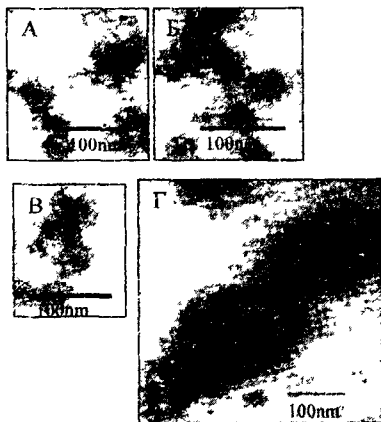


Рис. 3 Электронная микрофотография частиц HBcAg (А) и химерных частиц HBcAg-preS1 (Б), HBcAg-HBs (В), HBcAg-preS2 (Г) Негативное контрастирование уранил ацетатом

Это свидетельствует о том, что данная встройка нарушает структуру белка, тем не менее, полученный белок также формирует большой полиэпитопный антиген. Иммуноэлектронная микроскопия белка HBc-HBs с использованием МКА к эпитопу (137-147) а.о. HBsAg меченных коллоидным золотом, показала, что химерные частицы, сформированные из полипептида HBcAg-HBs, взаимодействуют с МКА к HBsAg, а частицы HBcAg не взаимодействуют с

эпими МКА. Это свидетельствует о том, что эпитоп (137-147) а.о. HBsAg экспонирован на поверхности гибридной коровой частицы и представлен в антигенно-активном виде

2. Анализ физико-химических параметров встроек в HBcAg

Столкнувшись с проблемой нарушения структуры HBcAg при встройке в него эпитопа из района preS2, мы решили проанализировать причины структурных изменений белка.

Представляется очевидным, что сохранение или утрата способности химерного HBcAg к самосборке зависит от физико-химических свойств аминокислотных остатков, входящих в состав встраиваемого чужеродного пептида. Для использования HBcAg как универсального носителя чужеродных эпитопов была бы полезна разработка алгоритма, позволяющего предсказать организацию химерного HBcAg до получения такой конструкции.

Для проведения анализа физико-химических свойств встроек была сформирована база данных встроек в основную антигенную детерминанту HBcAg и последствий таких встроек, включающая весь доступный нам фактический

материал. Часть ранее неопубликованных данных по отрицательным встройкам была любезно предоставлена нам другими исследователями.

Анализ аминокислотных последовательностей встроек проводили с использованием программы ProAnalyst (Eroshkin, 1995), а также программы SALIX и QSARPro (Иванисенко и Ерошкин, 1997). Для полноты исследования был взят широкий набор физико-химических свойств аминокислот: свойства Богардта (гидрофобность, объем и полярность) (Bogardt *et al*, 1980), структурные параметры Чоу-Фасмана (склонность аминокислот к образованию α -спиралей, β -структур, β -поворотов) (Chou and Fasman, 1978), заряд и др. Физико-химические характеристики встроек рассчитывались путем усреднения свойств аминокислотных остатков, входящих в анализируемые фрагменты последовательностей. Физико-химические параметры рассчитывались на 7, на 14 аминокислот с С конца пептидной вставки, и на всю длину вставки.

При анализе полных длин встроек высокой корреляции между жизнеспособностью и физико-химическими характеристиками а.о., входящих в состав встраиваемых фрагментов, выявлено не было.

Максимальная корреляция была выявлена при анализе фрагментов для С-концевых участков встроек (длиной 7 а.о. с С-конца.). Среди всех найденных корреляций наиболее статистически значимыми, превышающими 99% порог доверия, оказались индексы β -структуры ($R=-0,63$), гидрофобность ($R=-0,59$) и объем ($R=-0,55$), что согласуется с корреляциями, наблюдаемыми для полных последовательностей. Сходным был и характер выявленных связей: с ростом указанных параметров жизнеспособность химерных белков понижалась (см. рис. 4).

Используя полученную систему анализа были исследованы полученные в данной работе встройки. На рис. 4 представлены результаты анализа физико-химических параметров С-концевых участков встройки. Сравнивая параметры встроек с базой данных других последовательностей, можно заключить, что встройка эпитопа из района preS1 имеет характеристики, близкие к параметрам жизнеспособных встроек. Это предположение согласуется с экспериментально полученными данными. Встройка эпигона из района preS2 обладает параметрами, не позволяющими однозначно предположить ее влияние на самосборку HBcAg.

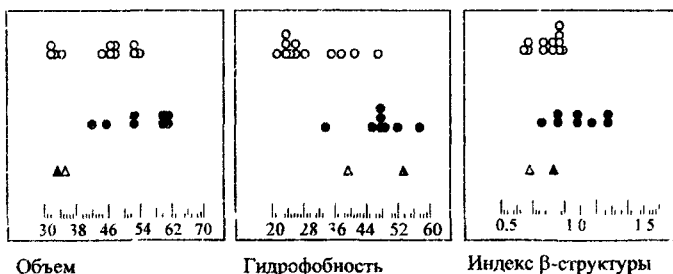


Рис. 4 Анализ физикохимических параметров аминокислотных последовательностей встроок в основную антигенную детерминанту HBsAg:

- - встройки, позволяющие химерному белку собираться в частицы;
- - встройки, нарушающие самосборку химерных белков,
- △ - встройка эпитопа, района preS1,
- ▲ - встройка эпитопа, района preS2.

Исходя из полученных результатов можно рекомендовать при встраивании чужеродных пептидов в HBsAg предварительно провести анализ физико-химических свойств пептидов-кандидатов в противовирусные вакцины. Если существует возможность выбора, то постараться выбрать такой кандидат, который бы обладал невысокими параметрами гидрофобности и объема и стремился к образованию β -структуры. В случае, когда пептид обладает хорошими иммунологическими свойствами, но не соответствует разработанным нами параметрам жизнеспособности, для решения проблемы самосборки можно использовать другие подходы. В частности, одним из возможных путей решения проблемы самосборки химерного HBsAg может оказаться введение фланкирующих цистеинов в целевой пептид, который предполагается встроить в коровый белок. Например, встройка основной антигенной детерминанты HBsAg в HBs-HBs белке обладает характеристиками, близкими к параметрам нежизнеспособных встроок, тем не менее, этот белок способен формировать частицы. Данная встройка фланкирована двумя цистеинами, поэтому возможно, что образование дисульфидного мостика позволяет образовать из встройки петлю и предотвратить конформационное изменение белка с утратой жизнеспособности.

3. Исследование иммуногенности химерных частиц HBcAg

Для оценки иммуногенности полученных химерных белков проводили внутримышечную иммунизацию мышей линии BALB/c очищенными индивидуальными белками HBc-preS1 и HBc-preS2 или HBcAg, дозой 5 мкг. Сыворотки животных забирали на 28 день после начала иммунизации и анализировали в ИФА. В качестве антигенов на планшеты сорбировали химерные белки HBc-preS1, HBc-preS2, HBcAg. Результаты анализа представлены на рис. 5.

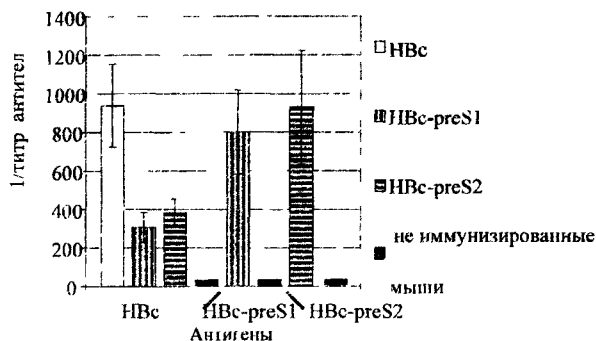


Рис. 5. Оценка гуморального иммунного ответа после однократной иммунизации химерными белками HBc-preS1, HBc-preS2 и белком HBcAg. В качестве антигена для ИФА были использованы очищенные рекомбинантные белки HBcAg, HBc-preS1 и HBc-preS2

Из представленных результатов видно, что гуморальный иммунный ответ к химерным белкам HBc-preS1 и HBc-preS2 у мышей при однократной иммунизации остается близким к ответу, стимулированному исходным белком HBcAg. При этом иммунный ответ на сам носитель – HBcAg в составе химерных белков

значительно ниже, чем на химерный белок. Таким образом, эпитопы, встроенные в основную антигенную детерминанту HBcAg, уменьшают высокую антигенность белка-носителя HBcAg и стимулируют синтез антител к встроенным последовательностям.

Для оценки иммунного ответа непосредственно на внедренные в HBcAg последовательности из района preS, сыворотки иммунизированных мышей анализировали с использованием синтетических пептидов с последовательностями встроенных эпитопов (рис. 6)

Из рис. 6 видно, что иммунизация гибридными белками HBc-preS1 и HBc-preS2 стимулирует синтез антител, специфичных соответствующим пептидам. Антитела к пептиду preS1 появляются уже при однократной иммунизации химерным белком HBc-preS1. При иммунизации мышей с адъювантом Фрейнда

обратный титр антител, специфично узнающих пептид preS1, увеличивается. В сыворотках мышей, иммунизированных белком HBc-preS2, обратный титр антител

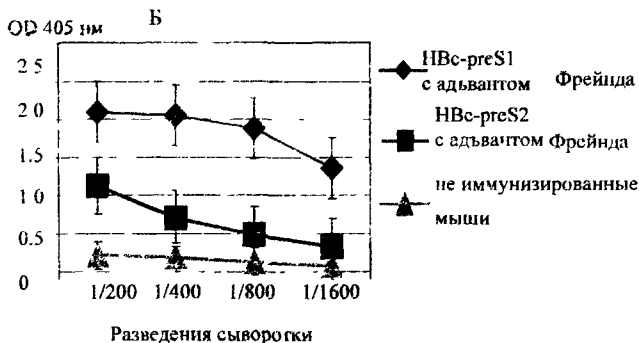
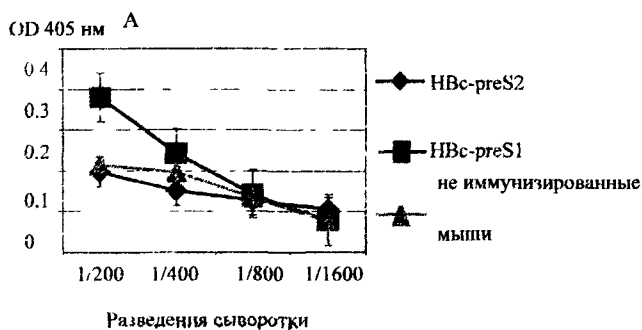


Рис. 6 Оценка гуморального иммунного ответа после однократной иммунизации (А) и грекратной с адъювантом Фрейнда (Б) В качестве антигена для ИФА были использованы синтетические биотинилированные пептиды: CSSDHQLDPAFRANS (27-37 а.о. preS1) и CSLQDPRVRGLYFPAGGS (131-145 а.о. preS2).

анализа отдельных сывороток. Было показано, что связывание антител сывороток животных, иммунизированных HBc-preS1 с данным белком эффективно ингибируется пептидом и HBcAg, в тоже время добавление только HBcAg слабо влияет на взаимодействие с химерным белком HBc-preS1. Сыворотки мышей иммунизированных HBc-preS2 напротив, эффективно ингибируются добавлением HBcAg, но слабо реагируют на добавление пептида с последовательностью из района preS2. Таким образом, в сыворотке иммунизированных мышей антител к последовательности из района preS1 регистрируется значительно больше, чем антител к последовательности из района preS2.

к пептиду preS2 был ниже.

Эти данные также были подтверждены с помощью ИФА, в котором сыворотки предварительно инкубировали с HBcAg или с HBcAg и соответствующим пептидом, а затем проводили анализ на планшетах с сорбированным химерным белком (рис.7). Результаты анализа сывороток мышей одной группы были аналогичны, поэтому приводятся данные

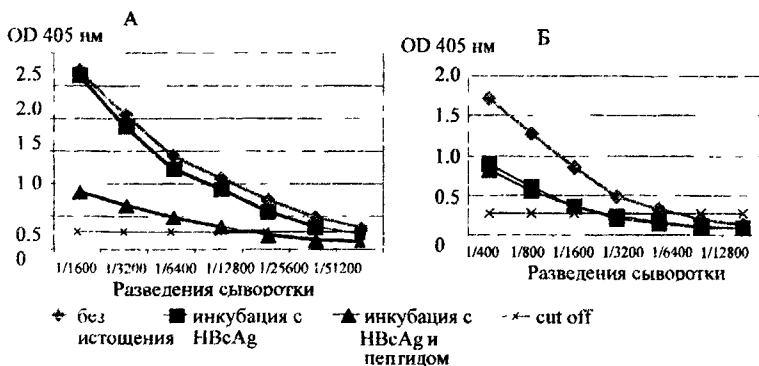


Рис. 7 Исследование иммунного ответа к встроенным эпитопам в белках HBc-preS1 и HBc-preS2. Сыворотки мышей, трехкратно иммунизированных белками HBc-preS1 и HBc-preS2 предварительно инкубировали с пептидами и HBcAg. Затем проводили иммуноферментный анализ с использованием белков HBc-preS1 и HBc-preS2 в качестве антигенов. Результаты всех сывороток в группах мышей аналогичны. Поэтому приводятся данные исследований конкретных сывороток, представляющих группы

А Сыворотка N1, из группы мышей, трехкратно иммунизированных HBc-preS1, истощенная пептидом CSSDHQLDPAFRANS, в качестве антигена использован HBc-preS1

Б Сыворотка N3, из группы мышей, трехкратно иммунизированных HBc-preS2, истощенная пептидом CSI QDPRVRGLYPFAGGS, в качестве антигена использован HBc-preS2

Возможно, этот факт может быть следствием различной иммуногенности эпитопов preS1 и preS2 или разной аффинностью антител, индуцированных иммунизацией этими белками. Вероятно и различная степень экспонирования встроенных эпитопов на поверхности белков HBc-preS1 и HBc-preS2.

Изменения, вносимые в последовательность HBcAg при встройках чужеродных эпитопов, кроме уменьшения собственной антигенности белка, могут повлиять и на другие параметры иммунного ответа, стимулируемого HBcAg. Следует отметить, что HBcAg является сильным индуктором Т-клеточного звена иммунитета, и данное качество может быть очень полезно для использования HBcAg или его химерных аналогов в качестве адъюванта для терапевтических ГВ вакцин. Поэтому, было необходимо выяснить, повлияло ли внедрения чужеродных эпитопов в структуру HBcAg на способность этого иммуногена стимулировать клеточный иммунный ответ.

Клеточный ответ оценивали по выявлению ИЛ-2-продуцирующих лимфоцитов методом ELISPOT. Иммунизацию 4 групп мышей линии BALB/c проводили белками HBcAg, HBc-HBs, HBc-preS1 и HBc-preS2 внутримышечно, двукратно, дозой 5 мкг белка без добавления адъювантов с интервалом в две недели.

В качестве специфических антигенов использовали белки HBcAg, HBc-HBs, HBc-preS1 и HBc-preS2, а также короткую форму HBcAg. В качестве отрицательного контроля был использован рекомбинантный белок TBI (Карпенко *и др.*, 2002).

Полученные результаты показали (Рис. 8), что при индукции спленоцитов химерными белками, количество лимфоцитов, продуцирующих Ил 2 увеличивается незначительно. Однако, индукция HBcAg лимфоцитов, мышей, иммунизированных химерными белками, увеличивает количество Ил2 синтезирующих клеток также эффективно, как и в группе мышей, иммунизированных HBcAg

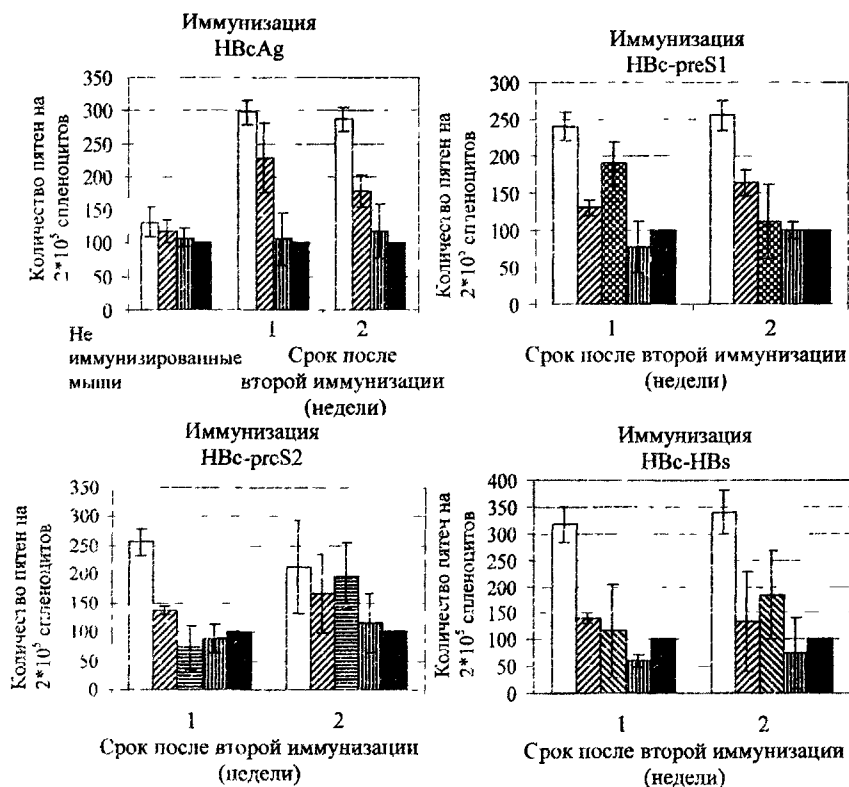


Рис. 8. Оценка количества спленоцитов, продуцирующих Ил2 у мышей иммунизированных HBcAg, HBc-preS1, HBc-preS2, HBc-HBs.

Спленоциты стимулировали: $\square$ HBcAg ▨ HBc-HBs ▩ HBc-preS1 ▧ HBc-preS2
 ▦ HBc-HBs ▨ TBI $\blacksquare$ без стимуляции.

Таким образом, все исследованные вакцинные конструкции способны индуцировать специфический клеточный ответ у иммунизированных животных также эффективно, как и нативный HBcAg. Следовательно, внедрение в основную антигенную детерминанту значительно не повлияло на способность химерных HBcAg стимулировать клеточный иммунный ответ.

Таким образом, сконструированные химерные белки HBc preS1, HBc-preS2 стимулируют синтез антител к встроенным эпитопам. Встройки эпитопов в химерных белках HBc-preS1, HBc-preS2 и HBc-HBs существенно не повлияли на способность белков стимулировать клеточный иммунный ответ. Полученные результаты дают основание полагать, что сконструированные химерные белки HBcAg с эпитопами поверхностного белка могут быть использованы в качестве компонентов вакцины против гепатита В.

4. Доставка HBcAg с помощью аттенуированного штамма сальмонеллы *S. enteritidis* E-23

Известно, что вирус гепатита В проникает в организм хозяина двумя путями: парентеральным и через поврежденную слизистую орального, генитального или ректального тракта. Соответственно, эффективные вакцины против HBV должны стимулировать как общий, так и секреторный иммунитет. Такие штаммы представляют интерес в связи с возможностью парентерального способа введения сконструированных на их основе вакцин, способностью активно индуцировать клеточный, гуморальный и секреторный звенья иммунитета, способствуя развитию резистентности у входных ворот инфекции (Schodel and Curtiss R Jr, 1995; Stocker, 2000).

Целью данной части работы было создание вектора доставки HBcAg на основе аттенуированного штамма сальмонеллы для стимуляции как системного, так и мукозального иммунного ответа.

Для создания рекомбинантного штамма сальмонеллы, продуцирующего HBcAg, в данной работе был использован аттенуированный штамм *S. enteritidis* E-23, полученный в Московской медицинской академии им. Сеченова. Данный штамм несет мутации в генах *суа* и *спг*. На мышах, телятах и обезьянах показано, что патогенность этого штамма снижена в 100 тыс. раз по сравнению с

родительским штаммом, при сохранении инвазивной активности (Рыжова и Бойченко, 1997). ЛД₅₀ для штамма *S. enteritidis* E-23 - 10^7 КОЕ (при внутрибрюшинном введении мышам).

В данной работе представлены результаты по получению и исследованию иммуногенности аттенуированного штамма *S. enteritidis* E-23, продуцирующего НВсAg

В результате трансформации клеток *S. enteritidis* E-23 плазмидой рКНВс был получен рекомбинантный штамм, обеспечивающий конститутивный синтез НВсAg. Уровень продукции корового белка в рекомбинантном штамме оценивали с помощью электрофореза в 15% ПААГ и иммуноблотинга, он составляет не более 1% от суммарных клеточных белков (рис.9). Как видно из рис. 9 рекомбинантный белок в иммуноблотинге взаимодействует с антителами кроликов, иммунизированных нативным НВсAg. Молекулярная масса полипептида составляет около 22 кДа, что соответствует ожидаемой.

Для оценки иммуногенных свойств рекомбинантных штаммов сальмонелл проводили иммунизацию мышей линии BALB/c. Животным вводили перектально по 10^8 клеток *S. enteritidis* E-23, несущих плазмиду рКНВс. Ни у одной из мышей этой линии не было обнаружено признаков патологии или заболевания в течение эксперимента. В качестве отрицательного контроля использовали исходный штамм сальмонеллы, не содержащих рКНВс.

Сыворотку животных брали через 2, 3 и 4 недели после начала

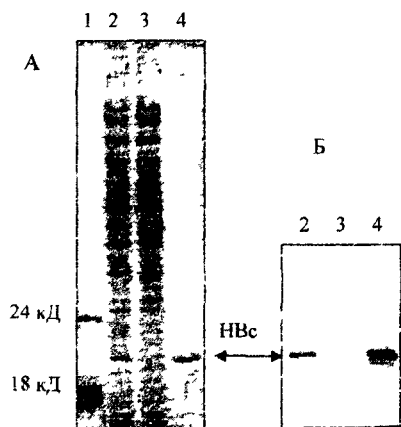


Рис 9 А. Электрофорез лизатов клеток *S. enteritidis* E23 в 15% ПААГ
Б. Иммуноблотинг белков после разделения в 15% ПААГ с моноклональными антителами к N-копцу белка НВсAg. На дорожках
1 - маркер молекулярной массы (18 и 24 кД);
2 - лизат клеток *S. enteritidis* E23, продуцирующих белок НВсAg,
3 - лизат клеток *S. enteritidis* E23;
4 - очищенный НВсAg

иммунизации и определяли количество специфических антител к НВсAg. На диаграмме (рис. 10 А) представлены результаты по определению специфических

антител в сыворотке иммунизированных животных. Как следует из представленных данных, однократная перектальная иммунизация мышей клетками сальмонелл штамма *S. enteritidis* E-23, продуцирующим НВсАг привела к появлению в сыворотке мышей антител к НВсАг.

Для анализа мукозального иммунного ответа было проведено исследование наличия антител IgA в смывах тонкого кишечника (рис.10 Б). Полученные данные свидетельствуют о том, что происходит синтез специфических антител класса IgA, следовательно, штамм *S. enteritidis* E-23/рКНВс стимулирует мукозальный иммунный ответ к НВсАг.

Таким образом, результаты исследования иммуногенности штаммов *S. enteritidis* E-23, продуцирующего НВсАг, продемонстрировали, что данный штамм при введении живым индуцирует специфический системный и мукозальный гуморальный иммунный ответ к НВсАг.

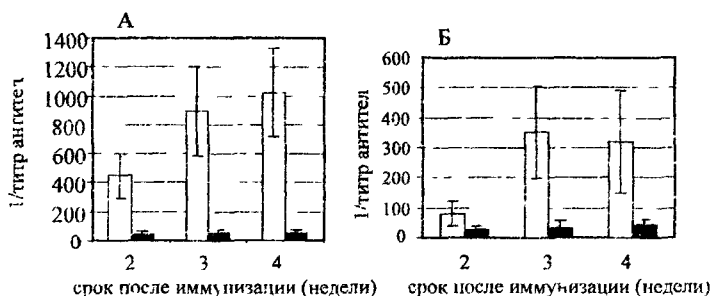


Рис 10. Оценка гуморального иммунного ответа у мышей, иммунизированных *S. enteritidis* E23/КНВс. Антитела, специфичные НВсАг класса IgG в сыворотке животных (А) и антитела, специфичные НВсАг класса IgA в смывах кишечника (Б)

5. Конструирование и исследование иммуногенных свойств ДНК-вакцины на основе НВсАг

Большое количество исследований подтверждает, что именно недостаточность цитотоксического иммунного ответа к коровому белку НВВ обуславливает хронизацию заболевания ГВ. Одним из современных подходов к усилению клеточного звена иммунитета при вакцинации является применение ДНК-вакцин. Было бы перспективно использование ДНК-вакцины на основе гена корового белка

корового белка HBV для создания профилактической и терапевтической вакцин против ГВ.

В данной работе была поставлена задача получения ДНК-вакциной конструкции, содержащей ген HBcAg и исследование ее иммуногенных свойств.

Для конструирования ДНК-вакцины был использован вектор pcDNA3.1, содержащий цитомегаловирусный промотор. Схема сконструированной плазмиды приведена на рис.11. Структура полученной рекомбинантной плазмиды была подтверждена рестрикционным анализом и секвенированием района встройки. Способность полученной плазмиды индуцировать синтез HBcAg в

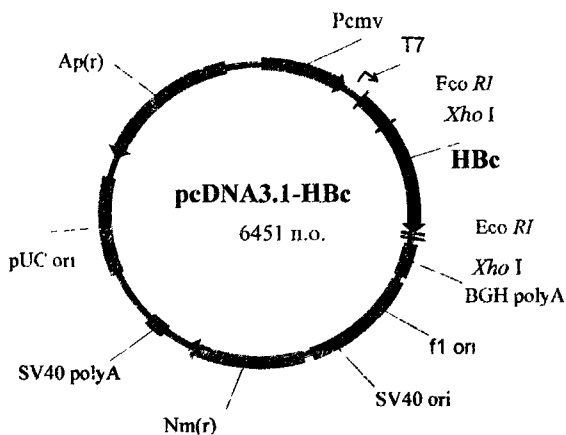


Рис 11.Схема плазмиды pcDNA3.1HBc.

эукариотических клетках, была подтверждена трансфекцией COS-клеток выделенной плазмидой pcDNA3.1-HBc, с последующим выявлением HBcAg с помощью специфических антител.

Для увеличения иммуногенности ДНК-вакцины плазмидную ДНК упаковывали в вирусоподобные частицы, содержащие полиглобин (Лебедев *et al*, 2000). Было проведено исследование иммуногенных свойств HBcAg при иммунизации мышей линии BALB/c (внутрибрюшно, двукратно с интервалом в две недели) вирусоподобными частицами, содержащими ДНК-вакцину pcDNA3.1-HBc (100 мкг ДНК на дозу). Было зафиксировано появление антител к HBcAg в сыворотках мышей, иммунизированных ДНК-вакциной pcDNA3.1-HBc.

Клеточный иммунный ответ исследовался с помощью метода ELISpot, было проведено сравнение количества спленоцитов, продуцирующих ИФН γ , Ил 2, и Ил 4 после индукции HBcAg, HBsAg и контрольным белком. Результаты

экспериментов приведены на рис 12. Было выявлено, что количество клеток, синтезирующих ИФН γ и Ил 2, после индукции НВсAg достоверно превышало количество клеток, продуцирующих ИФН γ или Ил 2 и стимулированных белком ТВИ в качестве отрицательного контроля или не стимулированных. В то же время достоверного повышения количества клеток, синтезирующих Ил 4, при стимуляции НВсAg или НВсAg не было выявлено. Таким образом, на основании этих результатов можно сделать вывод о стимуляции Тх1 звена иммунного ответа к НВсAg после иммунизации ДНК-вакциной pcDNA3.1-НВс.

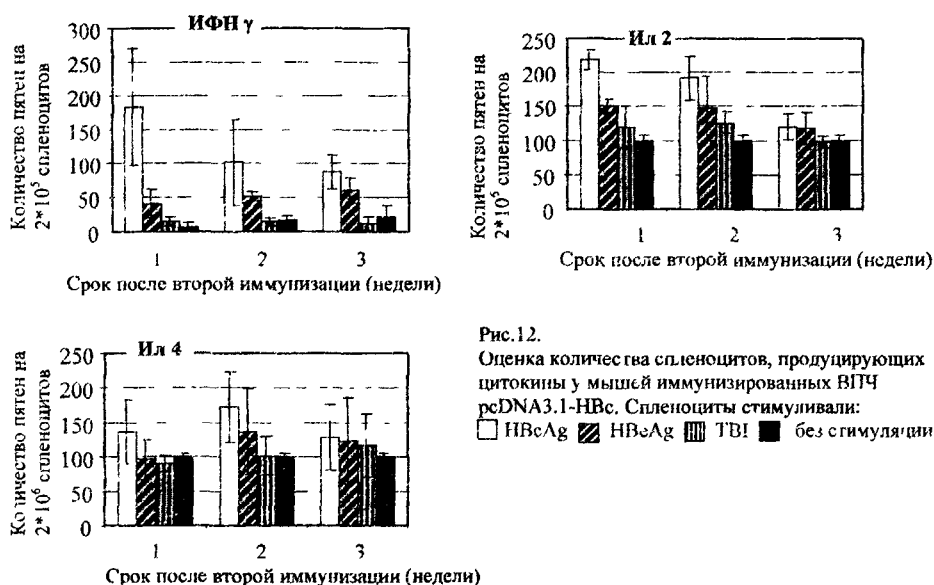


Рис.12.

Оценка количества спленоцитов, продуцирующих цитокины у мышей иммунизированных ВПЧ pcDNA3.1-НВс. Спленоциты стимулировали:

□ НВсAg ▨ НВсAg ▤ ТВИ ■ без стимуляции

Таким образом, сконструированная ДНК-вакцина, содержащая ген НВсAg, способна представлять НВсAg иммунной системе и стимулировать специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ.

Выводы

1. Сконструированы штаммы *E.coli*, обеспечивающие синтез химерных вариантов корового белка вируса гепатита В:
 - а) HBc-preS1, со встройкой эпитопа 27-37 а.о. района preS1 поверхностного белка HBV
 - б) HBc-preS2 со встройкой эпитопа 131-145 а.о. района preS2 поверхностного белка HBV

Показана способность полученных химерных белков к самосборке.

2. Впервые проанализировано влияние физико-химических параметров встройки в основную антигенную детерминанту HBcAg на способность этого белка к самосборке. Установлено, что самосборка химерных белков в вирусоподобные частицы нарушается в случае, когда встраиваемые пептиды содержат аминокислотные остатки, обладающие высокой гидрофобностью, большим объемом и склонностью к образованию β -структур.
3. Проведено изучение иммуногенных свойств химерных коровых белков В ходе проведения исследования:
 - а) Показано, что химерные коровые белки HBc-preS1 и HBc-preS2 стимулируют синтез антител к встроенным эпитопам.
 - б) Сконструированные химерные белки формировали в организме животных клеточный иммунный ответ, равный клеточному ответу на HBcAg.
4. Получен рекомбинантный аттенуированный штамм *Salmonella enteritidis* E-23/pKHBc, продуцирующий HBcAg. Показано, что рекомбинантный штамм сальмонеллы при ректальной иммунизации мышей линии Balb/c стимулирует как системный, так и мукозальный иммунный ответ к HBcAg.
5. Сконструирована ДНК-вакцина, содержащая ген HBcAg. Показано, что внутримышечная иммунизация мышей линии BALB/c полученной конструкцией стимулирует гуморальный иммунный ответ и клеточное звено иммунитета типа Th1 к HBcAg.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Г.А. Веремейко, Л.Р. Лебедев, Б.Н. Зайцев, Н.А. Некрасова, А.А. Ильичев, Л.И. Карпенко Конструирование химерных частиц HbcAg, несущих эпитопы районов preS поверхностного белка вируса гепатита В // Сибирский медицинский журнал.-2004.-Т19.- №2.-С.48-50.
2. Л.И. Карпенко, Г.А. Веремейко, О.Ю. Туманова, И.С. Пика, Н.А. Чикаев, Н.В. Меламед, Н.В.Нагайцева, В.Н. Кувшинов, И.А. Рязанкин, А.А. Ильичев Проблемы презентации эпитопов ВИЧ с помощью HbcAg // Вестник РАМН -2004 - №1.- С. 37-40.
3. А.А. Воробьев, М.Н. Бойченко, М.В. Донин, Г.А. Веремейко, Л.И. Карпенко, А.А. Ильичев. Перспектива создания нового поколения гепатевтической вакцины против гепатита В.// Молекулярная медицина -2003 - №2 - С. 54-56.
4. Л.И. Карпенко, Г.А. Веремейко, Г.М. Игнатьев, В.А. Порываева, С.И. Байбородин, М.И. Бойченко, А. А. Ильичев, А.А. Воробьев. Сравнительное исследование эффективности представления иммунной системе HbcAg с помощью аттенуированных штаммов *Salmonella* сероваров *S. enteritidis* и *S. typhimurium*. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии - 2001. -№5 -С.34-38.
5. L.I. Karpenko, V.A. Ivanisenko, I.A. Pika, N.A. Chikaev, A.M. Eroshkin, Г.А. Veremeiko, A.A. Ilyichev. Insertion of foreign epitopes in HbcAg: how to make the chimeric particle assemble.// Amino Acids. - 2000.-V.18(4). - P.329-37.
6. Л.И. Карпенко, Г.А. Веремейко, Г.М. Игнатьев, А.А. Ильичев, М.Н. Бойченко, А.А. Воробьев. Рекомбинантный аттенуированный штамм бактерий *Salmonella typhimurium* T10/pKHBc как продуцент корового антигена вируса гепатита В. Патент №2216590 Опубликовано в бюллетене по изобретениям №32 от 20.11.03.
7. Г.А. Veremeiko, N.A. Chikaev, V.A. Poryvaeva, N.A. Nekrasova, I.V. Savkin, L.I. Karpenko Delivery of Chimeric HbcAg Exposing PreS1, PreS2. and "a" HBsAg Epitopes by Attenuated *Salmonella* for Vaccine Development. Fifth John

Humphrey Advanced Summer Programme In Immunology, 13-19 September 2000, Pushino, Russia, p.104.

8. Т.А. Веремејко, Л.И. Карпенко, Г.М. Игнаше, В.А. Порывасва, С.И. Байбородин, М.Н. Бойченко, А.А. Воробьев, А. А. Ильичев. Сравнительное исследование эффективности представления иммунной системе HBcAg с помощью аттенуированных штаммов *Salmonella* сероваров *S. enteritidis* и *S. typhimurium*. 9-я международная конференция "СПИД, рак и родственные проблемы", 2001г., С-Петербург, Россия, с. 53
9. T.A. Veremeiko, N.A. Nekrasova, and L.I. Karpenko Delivery of chimeric hbcag exposing pres1, pres2, and "a" HBsAg epitopes by attenuated *Salmonella* for vaccine development. Sixth John Humphrey Advanced Summer Programme In Immunology, 15-22 September 2002, Pushino, Russia, p.141.
10. T.A. Veremeiko, N.A. Nekrasova, and L.I. Karpenko Delivery of chimeric HBcAg exposing pres1, pres2, and "a" HBsAg epitopes by attenuated *Salmonella* for vaccine development. Bacterial Virulence and Survival Course, 3-13 September, 2002, Spetses, Greece, p.112.
11. T.A. Veremeiko, L.R. Lebedev, B.N. Zaitsev, N.A. Nekrasova, A.A. Ilyichev, L.I. Karpenko Chimeric core particles hbcag carrying epitopes from pres region of HBV surface protein. 13th International symposium on HIV and emerging infectious diseases, 3-5 June, 2004, Toulon, France, p 302.
12. Т.А. Веремејко, Л.Р. Лебедев, Б.Н. Зайцев, Н.А. Некрасова, А.А. Ильичев, Л.И. Карпенко Конструирование химерных частиц HBcAg, несущих эпитопы районов preS поверхностного белка вируса гепатита В. Актуальные вопросы разработки, производства и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов. 16-17 июня, 2004г, Томск, Россия, с. 72.
13. T.A. Veremeiko, L.R. Lebedev, B.N. Zaitsev, N.V. McLamed, N.A. Nekrasova, A.A. Ilyichev, L.I. Karpenko Design and investigation immunogenic properties of chimeric HBV core particles carrying epitopes from surface protein of HBV. "New approaches to vaccine development, 28-10 September 2005, Berlin, Germany, p. 140



Подписано к печати 21 ноября 2005г.
Тираж 100 экз. Заказ № 1696.
Отпечатано "Документ-Сервис", 630090,
Новосибирск, Институтская 4/1, тел. 335-66-00

№25064

РНБ Русский фонд

2006-4

29969