

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ДНК-ВАКЦИННЫХ КОНСТРУКЦИЙ, КОДИРУЮЩИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ И Т-ХЕЛПЕРНЫЕ ЭПИТОПЫ ВИРУСА ЭБОЛА

© 2019 г. С. И. Бажан*, Д. В. Антонец, С. Г. Дудко,
О. Н. Каплина, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичёв

*E-mail: bazhan@vector.nsc.ru

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 29.03.2019

Отсутствие эффективных вакцин против вируса Эбола инициирует поиск новых подходов к решению этой проблемы. Одним из перспективных направлений в разработке противовирусных вакцин является конструирование ДНК-вакцин, кодирующих искусственные полиэпитопные иммуногены. Ранее с использованием оригинального программного обеспечения мы провели дизайн двух полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов, содержащих цитотоксические и Т-хелперные эпитопы вируса Эбола и показали, что созданные на их основе ДНК-вакцинные конструкции обеспечивают синтез целевых мРНК и белков в культуре эукариотических клеток. В рамках данной работы мы показали, что спроектированные ДНК-вакцинные конструкции индуцируют вирус-специфические ответы CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у иммунизированных мышей.

Ключевые слова: вирус Эбола, полиэпитопные Т-клеточные антигены, ДНК-вакцины, иммуногенность

DOI: 10.31857/S102872210006492-6

Адрес: 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бажан С. И.
Тел.: 8 (383) 363-47-10, 8 913913 2697 (моб.).

E-mail: bazhan@vector.nsc.ru

Авторы:

Бажан С. И., д.б.н., заведующий теоретического отдела ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирская область, Россия;

Антонец Д. В., к.б.н., с.н.с. теоретического отдела ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирская область, Россия;

Дудко С. Г., стажер-исследователь отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирская область, Россия;

Каплина О. Н., с.н.с. отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирская область, Россия;

Карпенко Л. И., д.б.н., заведующая лабораторией рекомбинантных вакцин отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирская область, Россия;

Ильичев А. А., д.б.н., заведующий отделом биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирская область, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ И ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Лихорадка Эбола или болезнь, вызванная вирусом Эбола (БВВЭ), – это острое заболевание,

сопровождающееся высоким уровнем летальности. Возбудителем заболевания являются РНК-содержащие вирусы, принадлежащие к семейству *Filoviridae*, род *Ebolavirus*. Первые вспышки БВВЭ были зарегистрированы в 1976 г. сначала в Заире и почти одновременно в Судане, после чего в странах Центральной Африки происходили спорадические вспышки, которые удавалось оперативно ликвидировать. Вспышка БВВЭ в западной Африке в 2014–2015 гг. оказалась на порядок более масштабной, что способствовало принятию мер по противодействию этой инфекции, в том числе направленных на разработку профилактических вакцин. Существует множество подходов к созданию вакцин против вируса Эбола, включая ДНК-вакцины, субъединичные вакцины, а также вакцины на основе реплицирующихся и нереплицирующихся вирусных векторов. Одним из перспективных направлений в разработке противовирусных вакцин является конструирование ДНК-вакцин, кодирующих искусственные полиэпитопные иммуногены. Такие вакцины представляют собой комбинацию эпитопов из

разных вирусных белков и объединенных в составе одной молекулы. Ранее с использованием оригинального программного обеспечения TEpredict/PolyCTLDesigner мы провели дизайн двух полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов EV.CTL и EV.Th, содержащих цитотоксические (CTL) и Т-хелперные эпитопы (Th) белков вируса Эбола [1]. Гены, кодирующие спроектированные антигены, были клонированы в эукариотическом векторе pcDNA3.1. Мы показали, что полученные рекомбинантные плазмиды pEV.CTL и pEV.Th – кандидаты ДНК-вакцины против вируса Эбола – обеспечивают синтез целевых мРНК и белков в культуре эукариотических клеток.

Целью настоящей работы явилось изучение способности полученных ДНК-вакцинных конструкций индуцировать специфический иммунный ответ на модели лабораторных животных.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ

При иммунизации использовались 5–6-недельные мыши BALB/c (самки) весом 16–18 г. Мышей иммунизировали внутримышечно трехкратно с интервалом две недели дозой 100 мкг ДНК-вакцины. Через две недели после последней иммунизации у животных удаляли селезенки, из которых выделяли спленоциты для анализа иммунного ответа Т-клеток. Для оценки иммунного ответа мышцей после иммунизации ДНК-вакцинами использовали два метода: ELISpot и ICS. Стимуляцию спленоцитов осуществляли с использованием смеси синтетических пептидов, входящих в состав сконструированных антигенов. Анализ IFN γ ELISpot проводили с использованием набора Becton Dickinson (США) в соответствии с инструкцией производителя. ICS выполняли в соответствии со стандартным протоколом BD Biosciences.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, полученные с помощью IFN γ ELISpot показали, что индукция специфического Т-клеточного ответа происходит в группах мышцей, иммунизированных как смесью ДНК-вакцинных конструкций (pEV.CTL+pEV.Th), так и конструкцией pEV.CTL, кодирующей поли-CTL-эпитопный антиген. Однако,

статистически значимые отличия от обоих отрицательных контролей (неиммунизированные мыши и мыши, иммунизированные векторной плазмидой pcDNA3.1) наблюдались только в группе (pEV.CTL+pEV.Th). При этом результаты, полученные с помощью ICS показали, что в отношении индукции IFN γ -продуцирующих CD8 $^{+}$ Т-лимфоцитов статистически значимые отличия от контроля были обнаружены в группах животных, иммунизированных как pEV.CTL, так и смесью (pEV.CTL+pEV.Th) вакцинных конструкций, тогда как в отношении индукции IFN γ -продуцирующих CD4 $^{+}$ Т-хелперов достоверный ответ наблюдался только в группе, иммунизированной смесью вакцинных конструкций (pEV.CTL+pEV.Th). Тот факт, что максимальные ответы IFN γ -продуцирующих CD8 $^{+}$ Т-лимфоцитов ($p=0,024$) и CD4 $^{+}$ Т-клеток ($p=0,012$) были зарегистрированы в группе животных, иммунизированных смесью вакцинных конструкций, возможно, обусловлен синергетическим эффектом CD8 $^{+}$ и CD4 $^{+}$ Т-лимфоцитов. Известно, что одним из недостатков ДНК-вакцинных векторов является их не высокая иммуногенность. Поэтому, для повышения эффективности исследуемых вакцин следующим этапом нашей работы станет использование специальных средств доставки плазмид, в частности дендримеров, которые представляют собой искусственные полимеры, имеющие сферическую структуру, содержащие плотное ядро и различные функциональные группировки на поверхности. Основные преимущества дендримеров, как средства доставки – их стабильность, высокий молекулярный вес, монодисперсность, низкая вязкость, наличие заряженных концевых групп.

Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания ГЗ-25/16.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Бажан С. И., Антонец Д. В., Карпенко Л. И., Орешкова С. Ф., Старостина Е. В., Дудко С. Г., Ильичев А. А.* Дизайн искусственных иммуногенов, содержащих Т-клеточные эпитопы белков вируса Эбола. Биотехнология 2018, Т. 34(6), 69–79. [Bazhan S. I., Antonets D. V., Karpenko L. I., Oreshkova S. F., Starostina E. V., Dudko S. G., Ilyichev A. A. Design of Artificial Immunogens Containing T-Cell Epitopes of Ebola Virus Proteins. // Biotechnologia. 2018.– Vol. 34(6), 69–79.]

IMMUNOGENICITY OF DNA VACCINE CONSTRUCTS ENCODING EBOLA VIRUS CYTOTOXIC AND T-HELPER EPITOPES

© 2019 S. I. Bazhan*, D. V. Antonets, S. G. Dudko,
O. N. Kaplina, L. I. Karpenko, A. A. Ilyichev

*E-mail: bazhan@vector.nsc.ru

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor,
Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 29.03.2019

The lack of effective vaccines against Ebola virus initiates a search for new approaches to solving this problem. One of the promising directions in development of antiviral vaccines based on designing DNA-vaccines encoding artificial polyepitope immunogens. Previously, using the original software, we designed two polyepitopic T-cell immunogens containing cytotoxic and T-helper epitopes of Ebola virus and showed that DNA vaccines based on them provide synthesis of target mRNA and proteins in a culture of eukaryotic cells. As part of this work, we have shown that engineered DNA vaccine constructs induce virus-specific responses of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes in immunized mice.

Key words: influenza virus, «universal vaccine», DNA vaccine, polyepitopic immunogen

Authors:

Bazhan S. I., ✉ PhD, Dr. Sci., head of Theoretical Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia. E-mail: bazhan@vector.nsc.ru;

Antonets D. V., PhD, researcher of Theoretical Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia;

Dudko S. G., researcher of Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia;

Kaplina O. N., researcher of Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia;

Karpenko L. I., PhD, Dr. Sci., head of Recombinant vaccines Laboratory of Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia;

Ilyichev A. A., PhD, Dr. Sci., head of Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia.