

УДК 606:578.74

Дизайн искусственных иммуногенов, содержащих Т-клеточные эпитопы белков вируса Эбола

© 2018 С.И. БАЖАН¹*, Д.В. АНТОНЕЦ¹, Л.И. КАРПЕНКО¹, С.Ф. ОРЕШКОВА¹,
Е.В. СТАРОСТИНА¹, С.Г. ДУДКО¹, А.А. ИЛЬИЧЕВ¹

¹ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Кольцово, Новосибирская обл., 630559

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

Поступила 04.09.2018 г.

Принята в печать 23.10.2018 г.

Описана технология конструирования двух искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов, один из которых содержит цитотоксические (CTL), а другой Т-хелперные (Th) эпитопы, идентифицированные в белках вируса Эбола: GP, VP24, VP30, VP35, L, VP40, и NP. Прогнозирование Т-клеточных эпитопов и проектирование последовательности целевых антигенов проводилось с использованием ранее разработанного авторами программного обеспечения TEPredict и PolyCTLDesigner. Гены, кодирующие целевые иммуногены, были разработаны с использованием кодонов, оптимизированных для достижения высокой экспрессии в клетках человека. Синтезированные гены были клонированы в эукариотическом векторе pcDNA3.1. Полученные рекомбинантные плазмиды – кандидаты ДНК-вакцины против вируса Эбола – использовались для доказательства экспрессии спроектированных целевых генов в клетках эукариот. Полученные ДНК-вакцинные конструкции являются перспективными кандидатами для дальнейших исследований их иммуногенных и протективных свойств.

Ключевые слова: лихорадка Эбола, полиэпитопные Т-клеточные иммуногены, компьютерный дизайн, ДНК-вакцинные конструкции, экспрессия генов.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-69-79

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*. Вирусы, принадлежащие к роду *Ebolavirus*, делятся на пять видов, различающихся как по уровню вызываемой летальности, так и по серологическим свойствам: Zaire, Sudan, Bundibugyo, Tai Forrest и Reston ebolaviruses. Первые вспышки БВВЭ были зарегистрированы в 1976 г. сначала в Заире (в настоящее время Демократическая Республика Конго) в районе

р. Эбола (*Zaire ebolavirus*) и почти одновременно в Судане (*Sudan ebolavirus*). Затем на протяжении почти 40 лет в странах Центральной Африки происходили спорадические вспышки этого заболевания, в которые было вовлечено от одного до нескольких десятков и даже нескольких сотен человек. Все эти вспышки удавалось оперативно ликвидировать. Вспышка лихорадки Эбола в западной Африке в 2014–2015 гг. оказалась на порядок более масштабной. В ходе ее ликвидации были задействованы усилия множества стран мира [1]. Дорогостоящая разработка вакцин и терапевтических препаратов для смертельного, но

Список сокращений: БВВЭ – болезнь, вызванная вирусом Эбола; моноАГ – моноклональные антитела; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ТАР – транспортер, ассоциированный с процессингом антигенов; CTL – цитотоксические Т-лимфоциты; ER – эндоплазматический ретикулум; HLA – человеческий лимфоцитарный антиген; LAMP 1 – ассоциированный с лизосомами мембранный белок 1; МНС – главный комплекс гистосовместимости; FBS – эмбриональная бычья сыворотка; PBS – фосфатно-буферный раствор; Th – Т-лимфоциты-хелперы.

редкого заболевания всегда выглядела нерентабельной и вызывала интерес только из-за потенциальной угрозы биотерроризма. Вспышка лихорадки Эбола в 2014–2015 гг. с более чем 11 тыс. погибших способствовала принятию мер по противодействию этой инфекции.

Существует множество подходов к созданию вакцин против вируса Эбола, включая ДНК-вакцины, субъединичные вакцины, а также вакцины на основе реплицирующихся и нереплицирующихся вирусных векторов [2]. Их защитная эффективность была оценена на моделях нечеловеческих приматов. Кроме того, на сегодняшний день описано несколько препаратов вакцин потенциально перспективных в борьбе с вирусом у человека, среди которых rVSV-ZEBOV [3], Ad5-EBOV [4], GamEvac-Combi [5] и др. Большая часть вакцин находится в стадии клинических испытаний.

В настоящее время правительство Демократической Республики Конго при поддержке ВОЗ и партнеров проводит кольцевую вакцинацию еще нелицензированной вакциной против вируса Эбола rVSV-ZEBOV. Вакцинация предлагается медицинским работникам, находящимся на переднем крае, и другим людям, находившимся в контакте с лицами с подтвержденными случаями заболевания, а также всем, кто контактировал с людьми, находившимися в контакте (сайт ВОЗ)¹.

Одним из перспективных направлений в разработке противовирусных вакцин является конструирование ДНК-вакцин, кодирующих искусственные полиэпитопные (мозаичные) иммуногены. Такие вакцины представляют собой комбинацию эпитопов, отобранных из разных вирусных белков и объединенных в одной молекуле [6–8]. Прогресс в идентификации Т-клеточных эпитопов, а также понимание механизмов процессинга и презентации антигенов по пути МНС I и II классов дает возможность для рационального дизайна искусственных полиэпитопных вакцин, вызывающих ответы цитотоксических (CD8+) и хелперных (CD4+) Т-лимфоцитов [6, 7, 9].

Цель настоящей работы – конструирование и биологическое тестирование искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов – кандидатов ДНК-вакцины против вируса Эбола, – разработанных с использованием методов компьютерного молекулярного дизайна.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Проектирование полиэпитопных иммуногенов, синтез и клонирование генов

Поиск Т-клеточных эпитопов и проектирование последовательности искусственных Т-клеточных иммуногенов (EV.CTL и EV.Th) проводились с использованием программного обеспечения TEpredict и PolyCTLDesigner [10, 11]. Гены, кодирующие целевые иммуногены, были разработаны с помощью программы GeneDesigner [12]; состав кодонов был оптимизирован для достижения более высокой экспрессии в клетках человека. Спроектированные гены были синтезированы (ЗАО «Евроген», Россия), а затем клонированы в составе плазмиды pcDNA3.1, которая является вектором для экспрессии генов эукариот. Последовательности клонированных генов были подтверждены секвенированием. Полученные рекомбинантные плазмиды pEV.CTL и pEV.Th – кандидаты ДНК-вакцины против вируса Эбола – использовались для доказательства экспрессии спроектированных целевых генов в клетках эукариот.

Оценка транскрипции целевых генов

Оценку синтеза специфических мРНК целевых генов проводили в эукариотических клетках 293Т, трансфицированных плазмидами pEV.CTL и pEV.Th, с использованием реагента MATra-A согласно инструкции производителя набора (PromoKine, Germany). Клетки выращивали в среде DMEM с 10%-ным содержанием FBS. Через 48 ч после проведения трансфекции из клеток выделяли мРНК при помощи набора для выделения РНК (Promega, USA), проводили обратную транскрипцию с использованием RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Германия). Все образцы мРНК, выделенные из трансфицированных клеток, обрабатывали ДНКазой, свободной от РНКазы. Далее, полученную кДНК использовали для проведения ПЦР с использованием специфических праймеров к гену *EV.CTL* (f^{CTL} —AACTCAGGCACTCTTCCTGC, r^{CTL} —TCGTACCGGAATCTCAGGGT) и гену *EV.Th* (f^{Th} —ACGTTGACAAGCTGAGGAGG, r^{Th} —GAGAGTCCCTCAGCCCAGAGA). Продукты амплификации анализировали в 1%-ном агарозном геле.

¹<http://www.who.int/ru/news-room/detail/21-05-2018-who-supports-ebola-vaccination-of-high-risk-populations-in-the-democratic-republic-of-the-congo>.

Иммунохимическое окрашивание препаратов трансфицированных клеток

Клетки промывали фосфатно-буферным раствором (рН 7) через 32 ч после трансфекции, затем фиксировали в смеси ледяного метанола/аcetона (1:1) при 40 °С в течение 30 мин и снова промывали PBS. Экспрессия генов *EV.CTL* и *EV.Th* была обнаружена путем иммуногистохимического окрашивания. Окрашивание осуществлялось с помощью антител моноАТ 29F2/30А6 (АО «Вектор-Бест», Россия) к маркерному эпитопу EPFRDYVDRFYKTL, входящему в состав всех конструкций, и конъюгата антител кролика против IgG мыши с пероксидазой хрена. При окрашивании использовали субстрат 3,3'-диаминобензидина тетрагидрохлорид.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стратегии проектирования полиэпитопных Т-клеточных антигенов

Для стимуляции ответа CD8⁺ Т-лимфоцитов вирусные антигены должны представляться предшественникам CTLs не как полноразмерные молекулы, а как короткие пептиды (8–12 а.о.) в комплексе с молекулами МНС I класса. Эти эпитопы образуются из эндогенно синтезируемых вирусных антигенов в результате протеасом-опосредуемого процессинга, после чего переносятся в просвет ER с помощью белков TAP, где связываются с образующимися молекулами МНС I класса [13, 14]. Поскольку протеасом-опосредуемый процессинг работает для антигенов, синтезируемых внутри клетки, то вакцина, индуцирующая Т-клеточный ответ, должна быть спроектирована в виде ДНК-вакцины, так как это наиболее естественный путь представления CTL-эпитопов CD8⁺ Т-лимфоцитам по пути МНС I класса [15].

В отличие от стимуляции CTLs, для стимуляции ответа CD4⁺ Т-лимфоцитов-хелперов антиген должен быть представлен этим клеткам в комплексе с молекулами МНС II класса. Обычно процессинг и презентация антигена происходят для внеклеточных антигенов, которые доставляются в клетки с помощью эндоцитоза и фагоцитоза. В данном случае процессинг антигена происходит в лизосоме.

Таким образом, при проектировании искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов, способных индуцировать ответы CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов на все включенные в ее состав эпитопы, необходимо обеспечить эффективный протеасом- и/или лизосом-опосредованный

процессинг продукта экспрессии целевого гена по пути МНС I и II классов. Для достижения этой цели используют различные стратегии:

1) объединение эпитопов в составе поли-CTL-эпитопной конструкции посредством спейсерных последовательностей, которые содержат сайты протеасомного расщепления [16–18], и/или мотивов для связывания с TAP [19–21];

2) объединение эпитопов в составе поли-Th-эпитопной конструкции с помощью мотива R/K-R/K, являющегося сайтом расщепления для ряда лизосомных катепсинов, участвующих в процессинге антигенов [22–23];

3) генетическое присоединение к N-концу полиэпитопного иммуногена последовательности убиквитина [24], для того, чтобы нацелить полиэпитопный иммуноген к протеасоме и презентовать CTL-эпитопы CD8⁺ Т-лимфоцитам по пути МНС I класса;

4) генетическое присоединение к C-концу полиэпитопного иммуногена последовательности тирозинового мотива белка LAMP-1 (Lysosomal-Associated Membrane Protein 1), чтобы направить полиэпитопный иммуноген из секреторного пути в лизосому [25–28] (цель – деградация полиэпитопного иммуногена и презентация освободившихся Th-эпитопов CD4⁺ Т-лимфоцитам по пути МНС II класса).

В нашем исследовании проведен дизайн двух искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов, один из которых содержит цитотоксические (CTL), а другой Т-хелперные (Th) эпитопы, идентифицированные в белках вируса Эбола: GP, VP24, VP30, VP35, L, VP40, и NP (рис. 1). Ранее мы показали, что добавление убиквитина к N-концу полиэпитопного антигена более эффективно индуцирует CD8⁺ Т-клеточный ответ, чем добавление сигнального пептида и C-концевого фрагмента LAMP-1 [29]. Поэтому в состав итоговой поли-CTL-эпитопной конструкции был добавлен N-концевой убиквитин, а дизайн поли-Th-эпитопного иммуногена проведен с использованием N-концевого сигнального пептида и C-концевого фрагмента LAMP-1.

Дизайн искусственного поли-CTL-эпитопного антигена вируса Эбола

Для проектирования целевого поли-CTL-эпитопного антигена (*EV.CTL*) в базе данных Immune Epitope Database (<http://iedb.org>) [20] был проведен поиск известных Т-клеточных эпитопов и пептидных фрагментов антигенов различных штаммов вирусов Эбола, для которых способность связываться

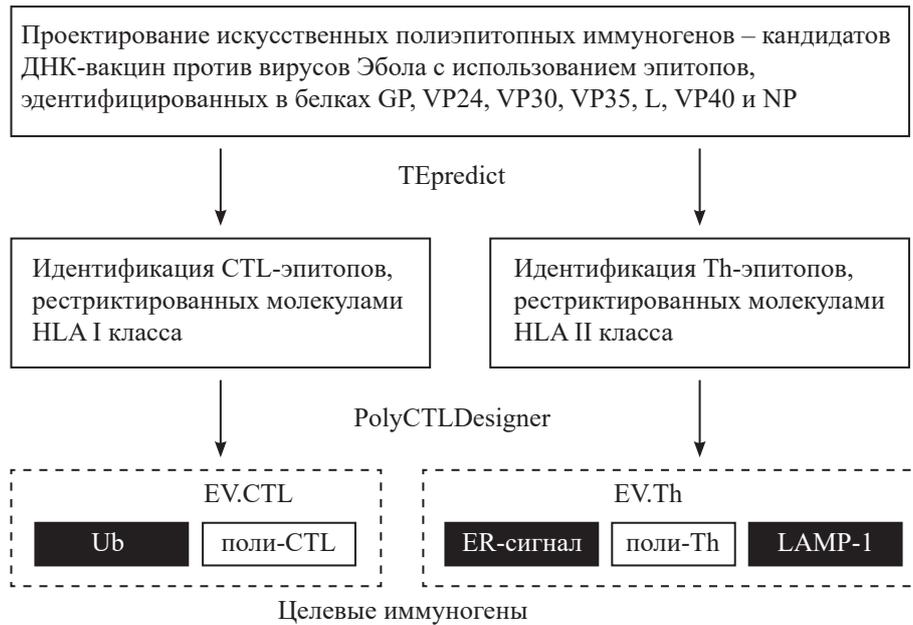


Рис. 1. Схема проектирования искусственных полиэпитопных антигенов вируса Эбола

Fig. 1. Designing artificial polyepitope antigens of Ebola virus

с различными алломорфами молекул МНС была доказана экспериментально. Всего в базе на момент проектирования антигенов (2016 г.) содержалась информация о 1134 уникальных пептидах из 65 антигенов 16 штаммов вирусов Эбола, проверенных на связывание с 60 алломорфами молекул МНС I класса (56 аллельными вариантами HLA).

Для анализа консервативности пептидов использовались 14556 аминокислотных последовательностей из NCBI ProteinBank (ncbi.nlm.nih.gov/protein), принадлежащих различным вирусам Эбола (Zaire, Sudan, Bundibugyo, Tai Forrest и Reston ebolaviruses). В рассмотрение принимались пептиды, для которых цитотоксическая актив-

ность была показана экспериментально. При этом для проектирования целевых иммуногенов выбирались те из них, которые показали достаточно высокую аффинность связывания с различными вариантами молекул HLA I класса ($pIC_{50} > 6.3$).

Далее отбирали пептиды, встретившиеся не менее чем в 1000 известных вирусных последовательностях и взаимодействующие, по крайней мере, с двумя аллельными вариантами молекул HLA. Всего было выбрано 44 пептида, которые в совокупности рестриктированы 34 аллельными вариантами молекул HLA I класса, в том числе наиболее распространенными в мировой популяции (табл. 1). Известно, что оптимально

Таблица 1

CD8+ CTL-эпитопы, предсказанные в последовательностях белков вируса Эбола

Predicted CD8+ CTL-epitopes in the sequences of Ebola virus proteins (antigens)

Эпитопы	Белки	Число вхождений эпитопов в известные вирусные последовательности	HLA-рестрикция эпитопов
ARLSSPIVL	L	1741	B*27:05; B*39:01; C*07:02
EYAPFARLL	NP	1764	A*24:03; A*24:02
FAEGVVAFL	GP	3881	B*39:01; A*02:01
FIYFGKKQY	L	1737	B*15:01; A*01:01; B*15:17
FLLQLNETI	GP	3862	A*02:01; A*24:02
FLSFASLFL	NP	1755	A*02:01; A*24:02; C*03:03
FPRCRYVHK	GP	3956	B*07:02; B*08:01
FRLMRTNFL	NP	1767	B*39:01; B*08:01; C*06:02

Эпитопы	Белки	Число вхождений эпитопов в известные вирусные последовательности	HLA-рестрикция эпитопов
FRYEFTAPF	L	1744	B*39:01; C*14:02
FTPQFLLQL	GP	3868	A*02:01; A*24:02
FVHSGFIYF	L	1739	A*24:03; A*23:01; B*35:01; A*26:02; B*15:01; A*02:06; C*03:03
GHMMVIFRL	NP	1768	B*39:01; A*02:01; A*24:02
GQFLSFASL	NP	1753	B*15:01; B*27:05
GYLEGTRTL	L	1748	A*24:03; A*23:01
HMMVIFRLM	NP	1768	A*02:01; A*24:02
HPLARTAKV	NP	1766	B*07:02; B*51:01
IISDLSIFI	L	1713	A*02:01; A*69:01
ILMNFHQKK	NP	1711	A*03:01; A*11:01
IMYDHLPGF	VP35	1737	B*58:01; C*12:03
KQIPIWLPL	VP40	1766	B*40:01; B*27:05
KVYWAGIEF	VP24	1702	B*15:01; B*35:01; C*14:02
LANETTQAL	GP	1242	B*07:02; B*35:01; C*03:03
LANPTADDF	VP30	1686	B*35:01; B*58:01
LPQYFTFDL	VP40	1763	B*07:02; B*35:01
LSDLCNFLV	VP24	1725	A*01:01; C*05:01
MMVIFRLMR	NP	1768	A*03:01; A*11:01
NFFHASLAY	L	1750	B*15:01; B*35:01
QFLSFASLF	NP	1755	A*24:03; A*24:02
RLASTVIYR	GP	3947	A*03:01; A*31:01
RLMRTNFLI	NP	1766	A*02:01; A*24:02
RTFSILNRK	GP	1207	A*03:01; A*11:01; A*31:01
RTSFFLWVI	GP	3802	A*02:01; A*24:02
RVPTVFHKK	VP30	1684	A*03:01; A*31:01
SFASLFLPK	NP	1756	A*03:01; A*11:01
TLASIGTAF	L	1743	B*15:01; B*35:01
TPVMSRFAA	L	1738	B*07:02; B*35:01
TRSFTTHFL	L	1747	B*39:01; C*06:02
TTIGEWAFW	GP	3824	A*24:02; B*58:01; A*68:23; A*32:15; A*32:07
TVAPPAPVY	NP	1684	A*11:01; B*35:01
VLYHRYNLV	L	1746	A*02:01; A*03:19
VQLPQYFTF	VP40	1763	B*15:01; A*24:03
YLEGHGFRF	NP	1739	A*02:01; A*24:02
YQGDYKLFL	NP	1705	A*02:01; A*24:02
YSGNIVHRY	L	1750	A*01:01; B*58:01

выбранные эпитопы, рестриктированные десятью различными аллелями HLA I класса, охватывают все населения любого географического региона [30, 31].

На основе выбранных Т-клеточных эпитопов проводился дизайн поли-CTL-эпитопного антигена EV.CTL. Использовалось ранее разработанное

программное обеспечение TEpredict/PolyCTLDesigner [10, 11], которое может служить универсальной платформой рационального проектирования полиэпитопных иммуногенов – кандидатов ДНК-вакцин для индукции Т-клеточного иммунитета как против инфекционных, так и против онкологических заболеваний.

PolyCTLDesigner позволяет выбрать минимальный набор эпитопов с известной или предсказанной специфичностью к разным аллельным вариантам молекул МНС I класса, охватывающий выбранный репертуар аллелей HLA с заданным уровнем избыточности. Затем для выбранного набора известных или предсказанных эпитопов PolyCTLDesigner оценивает аффинность связывания с TAP при помощи модели, разработанной Петерсом и коллегами [32] и по мере необходимости добавляет к N-концу эпитопа TAP-специфичные аминокислотные остатки (не более трех) для оптимизации связывания.

На следующем шаге PolyCTLDesigner проводит анализ всех возможных паросочетаний выбранных пептидов и для каждой пары определяет оптимальную спейсерную последовательность, обеспечивающую адекватное расщепление эпитопов с высвобождением C-конца проксимального пептида. Для прогноза протеасомного и/или иммунопротеасомного расщепления в PolyCTLDesigner используются модели, разработанные Тоузом и коллегами [33].

При анализе паросочетаний эпитопов PolyCTLDesigner создает ориентированный граф, в котором вершины соответствуют эпитопам, а ребра – допустимым паросочетаниям. Каждому ребру соответствует весовой вектор, атрибутами которого являются: эффективность протеасомного расщепления, длина спейсера и число предполагаемых нецелевых эпитопов на стыке. На заключительном этапе проектируется оптимальная результирующая последовательности полиэпитопного иммуногена, которая находится как полный простой путь в построенном графе, который имеет наименьшую длину.

В настоящей работе с помощью программы PolyCTLDesigner была предопределена аффинность связывания 44 выбранных пептидов (см. табл. 1) с TAP, и к пептидам на N-конец при необходимости добавлялся остаток аланина для увеличения эффективности взаимодействия. Дизайн поли-CTL-эпитопного фрагмента EV.CTL проводили, используя также вырожденный спейсерный мотив [ARSP][DLIT][LGA][VKA] с оптимизацией протеасомного расщепления и при эффективности протеасомного фильтра 10%.

Для тестирования иммуногенности спроектированной вакцинной конструкции на мышах с помощью методов ELISpot и ICS из базы данных Immune Epitope Database (<http://iedb.org>) [20] кроме 44 эпитопов, рестриктированных молекулами HLA I класса (табл. 1), было выбрано семь дополнительных пептидов, способных индуцировать цитотоксический ответ Т-лимфоцитов у мышей линии BALB/c: KFINKLDALH, NYNGLLSI, PGPAKFSLL, YFTFDLTALK, EYLFVDNL, LFLRATTEL, LYDRLASTV. На основе выбранных пептидов с помощью программы PolyCTLDesigner был создан “мышинный” полиэпитопный фрагмент, который был включен в C-конец спроектированной полиэпитопной конструкции. Для подтверждения синтеза спроектированного антигена в трансфицированных клетках в состав итоговой конструкции был включен C-концевой маркерный эпитоп EPFRDYVDRFYKTLR белка p24 HIV-1, узнаваемый моноклональными антителами 29F2 (рис.2).

Длина сконструированного полиэпитопа EV.CTL составляла 547 а.о., на долю спейсерных последовательностей приходилось 12.76%. Для нацеливания полиэпитопного иммуногена в

MMVIFRLMR-ADLS-GHMMVIFRL-KK-VQLPQYFTF-ADLS-KQIPIWLPL-RK-EYAPFARLL-RVPTVFHK
 K-FIYFGKKQY-R-VLYHRYNLV-ADL-YQGDKLFL-AFPRCRYVHK-ATPVMSRFAA-AFAEGVVAFL-KVY
 WAGIEF-R-TVAPPAPVY-TLASIGTAF-R-TTIGEWAFW-RK-LANETTQAL-FLLQLNETI-R-FVHSGFIY
 F-K-IISDLSIFI-R-NFFHASLAY-RR-LANPTADDF-K-ILMNFHQK-ADLS-FTPQFLQL-YSGNIVHR
 Y-ADLA-RTSFFLWVI-RTFSILNRK-RK-LSDLCNFLV-ADLV-HMMVIFRLM-ADLK-IMYDHLPGF-ALPQ
 YFTFDL-YLEGHGRF-R-FLSFASLFL-R-TRSFTTHFL-RLMRTNFLI-ADG-FRLMRTNFL-R-GQFLSFA
 SL-R-SFASLFLPK-RLASTVIYR-ARLSSPIVL-AHPLARTAKV-QFLSFASLF-R-GYLEGTRTL-R-FRYE
 FTAPF-KK-YFTFDLTALK-EYLFVDNL-R-PGPAKFSLL-RK-LFLRATTEL-RK-NYNGLLSI-R-LYDR
 LASTV-R-KFINKLDALH-SGSG-EPFRDYVDRFYKTLR

Рис. 2. Аминокислотная последовательность полиэпитопного фрагмента EV.CTL антигена. EPFRDYVDRFYKTLR – C-концевой маркерный эпитоп белка p24 HIV-1, узнаваемый моноклональными антителами 29F2; подчеркнутые аминокислотные остатки – спейсерные последовательности, содержащие сайты протеасомного расщепления

Fig. 2. Amino acid sequence of polyepitope fragment of EV.CTL antigen. EPFRDYVDRFYKTLR – C-terminal marker epitope of the HIV-1 p24 protein, recognized by monoclonal antibodies 29F2; underlined amino acid residues – spacer sequences containing proteasome cleavage sites

CD4+ Th-эпитопы, предсказанные в последовательностях белков вируса Эбола

Predicted CD4+ Th-epitopes in the sequences of Ebola virus proteins (antigens)

Последовательность пептида	Белки	Границы пептидов, а.о.	Число HLA-DR алломорф	Число Th-эпитопов
FKRTSFLLWVILFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKL	GP	14–51	48	11
TNTNHFNMRTQRVKEQLSLKMLSLIRSNILKFINKLDA	VP24	129–166	49	8
LTLDNFLYYLTTQIHNLPHRSLRILKPTFKHASVMSRL	L	1486–1523	50	5
TQTYHFIRTAKGRIKLVNDYLFKFFLIVQALKHNGTWQAE	L	2111–2150	48	10
WDRQSLIMFITAFNLIALQLPCESSAVVVSGLRTLVLPQSD	VP30	230–269	47	8
SSAFILEAMVNVISGPKVLMKQIPIWLPLGVADQKTYSF	VP40	70–108	42	8
QYPTAWQSVGHMMVIFRLMRTNFLIKFLLIHQGMHVMVAGH	NP	186–225	50	13
ESADSFLMLCLHAYQGDKLFLESGAVKYLE	NP	68–100	47	5

протеасому к N-концу итоговой поли-CTL-эпитопной конструкции была добавлена последовательность убиквитина.

Дизайн поли-Th-эпитопного вируса Эбола

Для наиболее эффективной индукции Т-клеточного иммунного ответа необходимо стимулировать ответ не только CD8+, но и CD4+ Т-лимфоцитов. Поэтому на следующем этапе было проведено конструирование поли-Th-эпитопного фрагмента (EV.Th). Было решено использовать Th-эпитопы, предсказанные для человека и обладающие наиболее широкой специфичностью по отношению к молекулам HLA II класса. Для этого с помощью программы TEPredict [10] проводился поиск Th-эпитопов в составе белков вируса Эбола. С помощью PolyCTLDesigner [11] было выбрано 8 фрагментов длиной от 35 до 40 а.о., содержащих наибольшее количество Th-эпитопов с наиболее широкой специфичностью по отношению к различным алломорфам HLA II класса. N-конец выбранных фрагментов был продлен на 5 а.о. относительно начала первого эпитопа, а

C-конец – на 5 а.о. относительно окончания последнего эпитопа (табл. 2).

Кроме того, в состав конструкции на C-конец дополнительно включены: универсальный Th-эпитоп PADRE (PAn DR Epitope) – AKFVAAW-TLKAAA; маркерный эпитоп EPFRDYVDRFYK-TLR белка p24 HIV-1, узнаваемый моноклональными антителами 29F2 и C-концевой фрагмент белка LAMP-1 – RKRSHAGYQTI. Согласно литературным данным, добавление к целевому антигену сигнального пептида одновременно с C-концевым фрагментом LAMP-1 значительно увеличивает уровень ответа CD4+ Т-лимфоцитов [34–37]. В качестве сигнального пептида была выбрана последовательность N-концевого фрагмента поверхностного гликопротеина вируса Эбола, содержащего лидерный пептид MGVTGILQLPRDR. С помощью сервера SignalP [37] было предсказано, что лидерный пептид в разработанном искусственном полипептиде функционален и должен эффективно отщепляться.

Дизайн поли-Th-эпитопного антигена EV.Th (рис. 3) был проведен с использованием

MGVTGILQLPRDR–FKRTSFLLWVILFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKL–**RR**–TNTNHFNMRTQRVKEQLSLKMLSLIRSNILKFINKLDA–**RR**–LTLDNFLYYLTTQIHNLPHRSLRILKPTFKHASVMSRL–**RR**–TQTYHFIRTAKGRIKLVNDYLFKFFLIVQALKHNGTWQAE–**RR**–WDRQSLIMFITAFNLIALQLPCESSAVVVSGLRTLVLPQSD–**RR**–SSAFILEAMVNVISGPKVLMKQIPIWLPLGVADQKTYSF–**RR**–QYPTAWQSVGHMMVIFRLMRTNFLIKFLLIHQGMHVMVAGH–**RR**–ESADSFLMLCLHAYQGDKLFLESGAVKYLE–**RR**–***AKFVAAWTLKAAA***–SGSG–***EPFRDYVDRFYKTLR***–SGSG–***RKRSHAGYQTI***

Рис. 3. Аминокислотная последовательность полиэпитопного фрагмента EV.Th антигена. Курсивом выделен N-концевой сигнальный пептид; AKFVAAWTLKAAA – PADRE-эпитоп; RR – мотив, являющийся сайтом расщепления для лизосомных катепсинов; подчеркивание – маркерный эпитоп; RKRSHAGYQTI – C-концевой фрагмент белка LAMP-1

Fig. 3. Amino acid sequence of polypeptide fragment of EV.Th antigen. EV.Th. Italics is N-terminal signal peptide; AKFVAAW-TLKAAA is PADRE epitope; underlined is marker epitope; RKRSHAGYQTI – C-terminal fragment of the protein LAMP-1

спейсерных последовательностей R/K-R/K, которые формируют сайты расщепления лизосомными катепсинами [22, 23].

Дизайн искусственных генов и получение рекомбинантных плазмид, кодирующих полиэпитопные иммуногены вируса Эбола

Обратная трансляция аминокислотных последовательностей проводилась с учетом частот встречаемости кодонов у человека [39]. Перед иницирующим кодоном ATG размещена последовательность Козак (CCGCCACC). В конце кодирующей последовательности добавлены три стоп-кодона (TAGTGATGA). Спроектированные гены *EV.CTL* и *EV.Th* были синтезированы и клонированы в составе векторной плазмиды pсDNA 3.1. В результате были сконструированы две рекомбинантные плазмиды: pEV.CTL и pEV.Th – кандидаты ДНК-вакцины против вируса Эбола.

Анализ экспрессии целевых генов

Экспрессию генов в составе плазмид pEV.CTL и pEV.Th оценивали двумя методами: по синтезу специфической мРНК и с помощью иммуноокрашивания трансфицированных клеток. Для оценки синтеза специфических мРНК выделяли суммарную РНК из клеток 293Т, трансфицированных плаزمидами pEV.CTL и pEV.Th, и получали кДНК в ОТ-ПЦР. Полученную кДНК использовали для проведения ПЦР с использованием пар праймеров (f^{CTL} , r^{CTL}) и (f^{Th} , r^{Th}) к генам *EV.CTL* и *EV.Th*, соответственно.

Результаты, представленные на рис. 4, показывают, что размеры амплифицированных фрагментов соответствуют теоретически рассчитанным размерам продуктов амплификации: 831 пн для гена *EV.CTL* и 495 пн для гена *EV.Th*. Аналогичные фрагменты ПЦР были получены при использовании в качестве матрицы исходных целевых плазмид pEV.CTL и pEV.Th (положительный контроль). Полученные данные указывают на наличие специфических мРНК в общей фракции клеточной РНК.

Иммуногистохимическое окрашивание клеток, трансфицированных плазмидами pEV.CTL и pEV.Th оценивали с помощью антител моноАТ 29F2/30A6 к маркерному эпитопу EPRFDY-VDRFYKTL, входящему в состав всех конструкций. Результаты, представленные на рис. 5, свидетельствуют о наличии специфических белков. Полученные данные, подтверждают экспрессию целевых генов как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции.

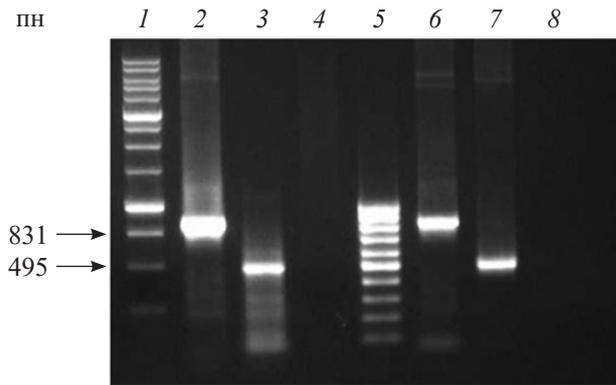


Рис. 4. Регистрация мРНК генов *EV.CTL* и *EV.Th* в препаратах суммарной РНК, выделенной из клеток 293Т, трансфицированных плазмидами pEV.CTL и pEV.Th. 1 – маркер молекулярных массы M12 («Сибэнзим»); 2 и 3 – продукты ПЦР с праймерами (f^{CTL} , r^{CTL}) и (f^{Th} , r^{Th}), соответственно; 4 и 8 – результаты ПЦР с праймерами (f^{CTL} , r^{CTL}) и (f^{Th} , r^{Th}) и суммарной РНК, выделенной из клеток 293Т, трансфицированных плазмидами pEV.CTL и pEV.Th, соответственно (без стадии обратной транскрипции; контроль на отсутствие целевых плазмид в выделенных образцах суммарной РНК); 5 – маркер молекулярной массы («Сибэнзим»); 6 и 7 – продукты ПЦР 831 и 495 пн, полученные с использованием в качестве матрицы исходных плазмид pEV.CTL и pEV.Th, соответственно (положительный контроль).

Fig. 4. Identification of *EV.CTL* and *EV.Th* genes mRNAs in total RNA isolated from 293T cells transfected with pEV.CTL and pEV.Th plasmids. 1 – Molecular weight marker (M12, SibEnzyme); 2 and 3 – PCR fragments with primers (f^{CTL} , r^{CTL}) and (f^{Th} , r^{Th}), respectively; 4 and 8 – The result s of PCR with primers (f^{CTL} , r^{CTL}) and (f^{Th} , r^{Th}) and total RNA isolated from 293T cells transfected with plasmids pEV.CTL and pEV.Th, respectively (without reverse transcription; control for the absence of target plasmids in isolated samples of total RNA); 5 – Molecular weight marker (M15, SibEnzyme); 6 and 7 – PCR fragments of 831 and 495 bps obtained using initial plasmids pEV.CTL and pEV.Th as a matrix, respectively (positive control)

Таким образом, в данной работе с использованием оригинального программного обеспечения TEpredict/PolyCTLDesigner в составе семи белков вируса Эбола (GP, VP24, VP30, VP35, L, VP40, и NP) предсказаны цитотоксические и Т-хелперные эпитопы, на основе которых проведен дизайн двух полиэпитопных иммуногенов *EV.CTL* и *EV.Th*. Получены рекомбинантные плазмиды – кандидаты ДНК-вакцины против вируса Эбола, – кодирующие спроектированные антигены. Показано, что полученные ДНК-вакцинные конструкции обеспечивают синтез соответствующих мРНК и белков в культуре эукариотических клеток и являются перспективными кандидатами для

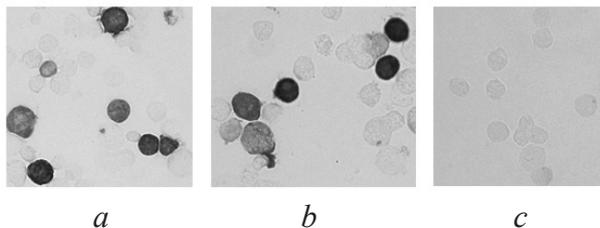


Рис. 5. Регистрация экспрессии генов *EV.CTL* и *EV.Th* в клетках 293Т, трансфицированных плазмидами pEV.CTL (a) и pEV.Th (b) и векторной плазмидой pcDNA3.1 (c)

Fig. 5. Evidence of genes expression in cells transfected with plasmids pEV.CTL and pEV.Th by immunohistochemical staining. (a) 293T-cells transfected with pEV.CTL plasmid. (b) 293T-cells transfected with pEV.Th plasmid. (c) 293T-cells transfected with pcDNA3.1 vector plasmid

дальнейших исследований их иммуногенных и протективных свойств.

Авторы выражают благодарность О.Ю. Волковой за иммуногистохимическое окрашивание трансфицированных клеток. Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания ГЗ-25/16.

ЛИТЕРАТУРА

1. Agua-Agum J., Ariyaratnam A., Aylward B., et al. West African Ebola epidemic after one year—slowing but not yet under control. *New England J. Medicine*, 2015, 372(6), 584–587. doi: 10.1056/NEJMc1414992
2. Marzi A., Feldmann H. Ebola virus vaccines: an overview of current approaches. *Expert Rev. Vaccin.*, 2014, 13(4), 521–531. doi: 10.1586/14760584.2014.885841
3. Henaou-Restrepo A.M., Camacho A., Longini I.M. et al. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ça Suffit!). *Lancet*, 2017, 389(10068), 505–518. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32621-6
4. Wu L., Zhang Z., Gao H., et al. Open-label phase I clinical trial of Ad5-EBOV in Africans in China. *Hum. Vaccin. Immunother*, 2017, 13(9), 2078–2085. doi: 10.1080/21645515.2017.1342021
5. Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., et al. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. *Hum. Vaccin. Immunother*, 2017, 13(3), 613–620. doi: 10.1080/21645515.2016.1238535
6. Bazhan S.I., Karpenko L.I., Ilyicheva T.N., et al. Rational-Design Based Synthetic Polyepitope DNA Vaccine for Eliciting HIV-Specific CD8+ T cell Responses. *Mol. Immunol.*, 2010, 47(7–8), 1507–1515. doi: 10.1016/j.molimm.2010.01.020
7. Hanke T., McMichael A.J. Design and construction of an experimental HIV-1 vaccine for a year-2000 clinical trial in Kenya. *Nature Medicine*, 2000, 6 (9), 951–955. doi: 10.1038/79626
8. Karpenko L.I., Bazhan S.I., Antonets D.V., Belaykov I.M. Novel approaches in polyepitope T-cell vaccine development against HIV-1. *Expert Rev. Vaccine*, 2014, 13(1), 155–173. doi: 10.1586/14760584.2014.861748
9. Khan M.A., Hossain M.U., Rakib-Uz-Zaman S.M., Morshed M.N. Epitope-based peptide vaccine design and target site depiction against Ebola viruses: an immunoinformatics study. *Scand. J. Immunol.*, 2015, 82(1), 25–34. doi: 10.1111/sji.12302
10. Antonets D.V., Maksyutov A.Z. TEpredict: Software for T-Cell epitope prediction. *Mol. Biol.*, 2010, 44(1), 119–127.
11. Antonets D.V., Bazhan S.I. PolyCTLDesigner: a computational tool for constructing polyepitope T-cell antigens. *BMC Res. Notes*, 2013, 10(6) 407. doi: 10.1186/1756-0500-6-407
12. Villalobos A., Welch M., Minshull J. *In silico* design of functional DNA constructs. *Methods Mol. Biol.*, 2012, 852, 197–213. doi: 10.1007/978-1-61779-564-0_15
13. van de Weijer M.L., Luteijn R.D., Wiertz E.J. Viral immune evasion: Lessons in MHC class I antigen presentation. *Semin. Immunol.*, 2015, 27(2), 125–37. doi: 10.1016/j.smim.2015.03.010
14. Yewdell J.W. DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing. *Trends Immunol.*, 2011, 32(11), 548–558. doi:10.1016/j.it.2011.08.001
15. Kutzler M.A., Weiner D.B. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Rev. Genetics*, 2008, 9 (10), 776–788. doi: 10.1038/nrg2432
16. Livingston B.D., Newman M., Crimi C. Optimization of epitope processing enhances immunogenicity of multiepitope DNA vaccines. *Vaccine*, 2001, 19(32), 4652–4660.
17. Depla E., Van der Aa A., Livingston B.D., et al. Rational Design of a Multiepitope Vaccine Encoding T-Lymphocyte Epitopes for Treatment of Chronic Hepatitis B Virus Infections. *J. Virol.*, 2008, 82(1), 435–450. doi: 10.1128/JVI.01505-07
18. Schubert B., Kohlbacher O. Designing string-of-beads vaccines with optimal spacers. *Genome Med.*, 2016, 26(8), 1–9. doi: 10.1186/s13073-016-0263-6
19. Uebel S., Wiesmuller K.H., Jung G., Tampe R. Peptide libraries in cellular immune recognition. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1999, 243, 1–21.

20. Peters B., Sidney J., Bourne P., et al. The immune epitope database and analysis resource: From vision to blueprint. *PLoS Biology*, 2005, 3(3), 379–381. doi: 10.1371/journal.pbio.0030091
21. Cardinaud S., Bouziat R., Rohrlich P. S. et al. Design of a HIV-1-derived HLA-B07.02-restricted polyepitope construct. *AIDS*, 2009, 23(15), 1945–1954. doi: 10.1097/QAD.0b013e32832fae88
22. Schneider S.C., Ohmen J., Fosdick L., et al. Cutting edge: introduction of an endopeptidase cleavage motif into a determinant flanking region of hen egg lysozyme results in enhanced T cell determinant display. *J. Immunol.*, 2000, 165(1), 20–23.
23. Zhu H., Liu K.C., Cerny J., Moudgil K.D. Insertion of the dibasic motif in the flanking region of a cryptic self-determinant leads to activation of the epitope-specific T cells. *J. Immunol.*, 2005, 175(4), 2252–2260.
24. Varshavsky A., Turner G., Du F.Y., Xie Y.M. The ubiquitin system and the N-end rule pathway. *Biol. Chemistry*, 2000, 381(9–10), 779–789. doi: 10.1515/BC.2000.10
25. Rowell J.F., Ruff A.L., Guarneri F.G., et al. Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T-cells. *J. Immunol.*, 1995, 155(4), 1818–1828.
26. Ruff A.L., Guarneri F.G., Staveley K., et al. The enhanced immune response to the HIV gp160/LAMP chimeric gene product targeted to the lysosome membrane protein trafficking pathway. *J. Biol. Chemistry*, 1997, 272(13), 8671–8678.
27. Guarneri F.G., Arterburn L.M., Penno M.B. The motif TYR-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein-1. *J. Biol. Chemistry*, 1993, 268(3), 1941–1946.
28. Wu T.C., Guarneri F.G., Staveleyocarrroll K.F., et al. Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class-II presentation of antigens. *Proceedings National Acad. Sci. USA*, 1995, 92(25), 11671–11675.
29. Reguzova A., Antonets D., Karpenko L., et al. Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T cell-epitope immunogens. *PLoS ONE*, 2015, 10(3). doi: 10.1371/journal.pone.0116412
30. Sette A., Sidney J. HLA supertypes and supermotifs: a functional perspective on HLA polymorphism. *Current Opinion Immunology*, 1998, 10, 478–482.
31. Sidney J., Grey H.M., Kubo R.T., Sette A. Practical, biochemical and evolutionary implications of the discovery of HLA class I supermotifs. *Immunology Today*, 1996, 17, 261–266.
32. Peters B., Bulik S., Tampe R., et al. Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. *J. Immunology*, 2003, 171(4), 1741–1749.
33. Toes R.E., Nussbaum A.K., Degermann S., et al. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.*, 2001, 194(1), 1–12.
34. Bonehill A., Heirman C., Tuyaerts S., et al. Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules. *J. Immunol.*, 2004, 172(11), 6649–6657.
35. Bonini C., Lee S.P., Riddell S.R., Greenberg P.D. Targeting antigen in mature dendritic cells for simultaneous stimulation of CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol.*, 2001, 166(8), 5250–5257.
36. Kim T.W., Hung C.F., Boyd D., et al. Enhancing DNA vaccine potency by combining a strategy to prolong dendritic cell life with intracellular targeting strategies. *J. Immunol.*, 2003, 171(6), 2970–2976.
37. Fassnacht M., Lee J., Milazzo C., et al. Induction of CD4(+) and CD8(+) T-cell responses to the human stromal antigen, fibroblast activation protein: implication for cancer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11(15), 5566–5571. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0699
38. Petersen T.N., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods*, 2011, 8(10), 785–786. doi: 10.1038/nmeth.1701
39. Deml L., Bojak A., Steck S., et al. Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J. Virol.*, 2001, 75(22), 10991–11001. doi: 10.1128/JVI.75.22.10991-11001.2001

Design of Artificial Immunogens Containing T-Cell Epitopes of Ebola Virus Proteins

S.I. BAZHAN^{1,*}, D.V. ANTONETS¹, L.I. KARPENKO¹, S.F. ORESHKOVA¹, E.V. STAROSTINA¹, S.G. DUDKO¹, and A.A. ILYICHEV¹

¹State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 630559, Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, Russia

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

Received September 4, 2018

Revised October 23, 2018

Accepted December 15, 2018

Abstract—A technique for the construction of two artificial polypeptide T-cell immunogens, one of which contains cytotoxic (CTL), and the other T-helper (Th) epitopes identified in the Ebola virus proteins GP, VP24, VP30, VP35, L, VP40 and NP, has been described. The T-cell epitopes were predicted and the sequences for the target antigens were designed using the previously developed software of TEPredict and PolyCTLDesigner. The genes encoding the target immunogens were developed using codons optimized to achieve high expression in human cells. The synthesized genes were cloned in a eukaryotic vector pcDNA3.1. The resulting recombinant plasmids, candidates for the DNA vaccine against Ebola virus, were used to prove the expression of the designed target genes in the eukaryotic cells. The obtained DNA vaccine constructs are promising candidates for the further studies of their immunogenic and protective properties.

Key words: Ebola Virus Disease, polypeptide T-cell immunogens, computer design, DNA vaccine constructs, gene expression.

Acknowledgement – The authors are grateful to O. Yu. Volkova for immunohistochemical staining of transfected cells. The study was supported GZ-25/16 state assignment.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-69-79