

УДК 577.2; 578.2

## КОМБИНИРОВАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ И АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ БЕЛКА NS3 ВИРУСА ГЕПАТИТА С, ГЕНА ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА И БЛОКАТОРА РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК ИНДУЦИРУЕТ ЭФФЕКТИВНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

© 2012 г. О. В. Масалова<sup>1\*</sup>, Е. И. Леснова<sup>1</sup>, Л. Н. Шингарова<sup>2</sup>, В. Л. Туницкая<sup>3</sup>, Т. И. Уланова<sup>4</sup>, А. Н. Бурков<sup>4</sup>, А. А. Куш<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России, Москва, 123098

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997

<sup>3</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

<sup>4</sup>Научно-производственное объединение “Диагностические системы”, Нижний Новгород, 603093

Поступила в редакцию 12.09.2011 г.

Принята к печати 03.11.2011 г.

Гепатит С относится к наиболее важным социально значимым инфекционным заболеваниям человека, однако вакцина против этого вируса до настоящего времени не создана. Одним из возможных компонентов вакцины считается неструктурный белок NS3 вируса гепатита С (ВГС), который синтезируется в зараженных клетках и проявляет протеазную, нуклеозидтрифосфатазную и хеликазную активности. Показана связь между эффективностью Т-клеточного ответа на эпитопы NS3 и спонтанным разрешением острого гепатита С. Цель данной работы состояла в сравнительном анализе иммунного ответа мышей на введение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей NS3 ВГС и их комбинации, в оценке адьювантной активности гена цитокина гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и влияния регуляторных Т-клеток на эффективность иммунного ответа. Максимальный титр антител к NS3 (до 1 : 640 000) индуцировал рекомбинантный белок NS3 (rNS3), введенный с гидроксидом алюминия. Наиболее интенсивный клеточный иммунный ответ получен при одновременном введении rNS3 и ДНК, кодирующей полноразмерный белок NS3, совместно с геном GM-CSF. В этой группе мышей достигнут высокий уровень пролиферации лимфоцитов, накопления IFN- $\gamma$ -секретирующих клеток и продукции цитокинов IFN- $\gamma$  и IL-2 в ответ на стимуляторы – рекомбинантные белки NS3 различного состава. Установлено, что подавление регуляторных Т-клеток *in vitro* приводит к статистически значимому увеличению секреции IFN- $\gamma$ . Таким образом, одновременное введение нескольких компонентов: rNS3 и ДНК, кодирующих полноразмерные белки NS3 и GM-CSF, – перспективный подход к созданию вакцины против гепатита С. Вопрос о целесообразности включения в состав вакцины ингибиторов регуляторных Т-клеток будет решаться на основании результатов специальных исследований.

**Ключевые слова:** вирус гепатита С, неструктурный белок NS3, трансфекция, ДНК-иммунизация, рекомбинантный белок, иммунный ответ, регуляторные Т-клетки, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.

THE COMBINED APPLICATION OF NUCLEOTIDE AND AMINO ACID SEQUENCES OF NS3 HEPATITIS C VIRUS PROTEIN, DNA ENCODING GRANULOCYTE MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR AND INHIBITOR OF REGULATORY T CELLS INDUCES EFFECTIVE IMMUNE RESPONSE AGAINST HEPATITIS C VIRUS, by O. V. Masalova<sup>1\*</sup>, E. I. Lesnova<sup>1</sup>, L. N. Shingarova<sup>2</sup>, V. L. Tunitskaya<sup>3</sup>, T. I. Ulanova<sup>4</sup>, A. N. Burkov<sup>4</sup>, A. A. Kushch<sup>1</sup> (Ivanovsky Institute of Virology,

Принятые сокращения: ConA – конканавалин А; CTLA (cytotoxic T lymphocyte antigen) – цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген; GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор мышей; mAb – моноклональные антитела; NS – неструктурный белок; Treg – регуляторные Т-клетки; ВГС – вирус гепатита С; ИСП – индекс стимуляции пролиферации; РБТЛ – реакция бласттрансформации лимфоцитов; ИФА – иммуноферментный анализ.

\* Эл. почта: ol.mas@mail.ru

Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia, \*e-mail: ol.mas@mail.ru; <sup>2</sup>Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia; <sup>3</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; <sup>4</sup>NPO Diagnostic Systems Ltd, N.-Novgorod, 603093 Russia). Hepatitis C is related to the most important socially significant human infectious diseases; however, vaccine against this virus up to now has not been created. One of the possible components of vaccine is the nonstructural protein NS3 of hepatitis C virus (HCV), which is synthesized in the infected cells and displays protease, NTPase, and helicase enzymatic activities. The connection between the effectiveness of T cellular response to NS3 epitopes and the spontaneous resolution of acute hepatitis C was shown. The purpose of this work was to compare the immune response of mice to the inoculation of nucleotide and amino acid sequences of HCV NS3 and their combination, to evaluate the adjuvant activity of the DNA encoding granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and the influence of regulatory T cells on the effectiveness of immune response. The maximum anti-HCV NS3 antibody level in the serum (to 1 : 640000) induced the recombinant protein rNS3 introduced with aluminum hydroxide. The most intensive cellular immune response was observed after the simultaneous administration of rNS3 and DNAs encoding full-size NS3 and GM-CSF. A high level of lymphocyte proliferation, accumulation of IFN- $\gamma$ -secreting cells and IFN- $\gamma$ , and IL-2 release in response to the stimulators – NS3 antigens of different composition were observed in this group of mice. It has been established that the suppression of regulatory T cells *in vitro* leads to the statistically significant increase in the secretion of IFN- $\gamma$ . Thus, simultaneous application of rNS3 along with the DNAs encoding full-size NS3 and GM-CSF is promising approach for development of hepatitis C vaccine. The expediency of inclusion in the vaccine composition of regulatory T cell inhibitors will be clear after special studies.

**Keywords:** hepatitis C virus, nonstructural protein NS3, transfection, DNA immunization, recombinant protein, immune response, regulatory T cells, granulocyte macrophage colony-stimulating factor.

Гепатит С относится к наиболее важным социально значимым инфекционным заболеваниям человека и считается одной из главных причин хронических заболеваний печени, включая цирроз и гепатоцеллюлярную карциному. Около 3% человеческой популяции на Земле инфицировано вирусом гепатита С (ВГС), и ежегодно число инфицированных увеличивается на 3–4 млн [1].

Вакцина против ВГС до настоящего времени не создана. Имеющиеся данные позволяют заключить, что решающий фактор при элиминации ВГС – клеточный иммунный ответ [1, 2]. Т-клеточные эпитопы обнаружены в разных белках ВГС, при этом наибольшее их количество локализовано в составе NS3, NS5B, NS5A и E2 [3, 4]. Особый интерес представляет белок NS3, так как найдена корреляция между эффективным Т-клеточным ответом на этот антиген и спонтанным разрешением острого гепатита С [5, 6]. Белок NS3 (67 кДа) локализуется между 1027 и 1658 аминокислотными остатками полипротеина ВГС и обладает тремя каталитическими функциями: сериновая протеаза, нуклеозидтрифосфатаза (НТРаза) и РНК-хеликаза [2]. В составе NS3 идентифицировано несколько Т-клеточных детерминант, локализованных как в протеазном, так и в хеликазном доменах: в участках 1073–1081, 1080–1088, 1248–1261, 1388–1407 и 1450–1469 аминокислотной последовательности [4, 7].

Основной подход к созданию вакцин против ВГС в настоящее время ограничивается разработками по получению индивидуальных рекомбинантных белков, отдельных пептидов или ДНК-конструкций [8, 9]. Известно, что искусственные антигены представляют собой относительно сла-

бые иммуногены. В связи с этим активно прорабатывается вопрос о составе адъювантов. В ряде работ показано, что усиления иммунного ответа на суррогатные антигены можно добиться, применяя гены цитокинов и ростовых факторов [10, 11]. Одним из перспективных кандидатов на роль адъюванта считается ген гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора мышей (GM-CSF). Роль регуляторных Т-клеток (Treg) при гепатите С практически не изучена. Предполагают, что эти клетки могут подавлять развитие иммунного ответа. Для проверки этого предположения нами использован блокатор Treg – моноклональные антитела (mAb), взаимодействующие со специфическим рецептором CTLA-4.

Цель данной работы состояла в том, чтобы сравнить иммунный ответ мышей на введение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, соответствующих гену или белку NS3 ВГС, по отдельности и в комбинации друг с другом, и оценить адъювантную активность гена GM-CSF и влияния Treg на эффективность иммунного ответа.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Плазмиды и рекомбинантные белки.** Получение плазмиды pсDNA-NS3 для эукариотической системы экспрессии, содержащей полноразмерный ген неструктурного белка NS3 ВГС генотипа 1b, описано ранее [12]. Получение ДНК-конструкции pсDNA-GM-CSF описано в работе [13]. Плазмидные ДНК очищали с помощью набора Wizard PureFectin Plasmid DNA Purification Sys-

tem (“Promega”, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Использованы 4 рекомбинантных белка (r), содержащих следующие последовательности NS3 ВГС: 1) участок аминокислотной последовательности 1192–1459, 2) часть хеликазного домена (аминокислотные остатки 1356–1459), 3) полно-размерный белок NS3 (аминокислотные остатки 1027–1658) и 4) протеазный домен NS3 (аминокислотные остатки 1027–1229). Получение плазмид, кодирующих rNS3, и аффинная очистка белков описаны ранее [14–16].

**Трансфекция эукариотических клеток.** Для изучения способности плазмиды рсDNA-NS3 экспрессировать в клетках млекопитающих ген белка NS3 ВГС использовали перевиваемую клеточную линию почек зеленой мартышки (Vero). Культивирование клеток описано ранее [17]. За сутки до трансфекции вносили  $5 \times 10^4$  клеток в 24-луночные культуральные планшеты (“Nunc”, Дания). Трансфекцию проводили с использованием реагента метафектин (“Biontex”, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Экспрессию белка NS3 оценивали в реакции непрямой иммунофлуоресценции с использованием mAb к белку NS3 (клоны 5B2 и 2G12) [14] и конъюгированных с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) антител к мышинным иммуноглобулинам (“DAKO”, Дания). Количество флуоресцирующих клеток подсчитывали с помощью флуоресцентного микроскопа (“Olympus”, Германия) при длине волны 520/560 нм.

**Иммунизация мышей.** Для иммунизации использовали самок мышей линии DBA/2J (H-2<sup>d</sup>) в возрасте 6–8 недель, полученных из Центрального питомника лабораторных животных “Крюково” РАМН. Каждая группа состояла из 5 животных. Мышам вводили очищенную плазмидную ДНК рсDNA-NS3 (внутримышечно в четырехглавую мышцу бедра задних лап) и/или rNS3\_1192-1459 (внутрибрюшинно) дважды с интервалом в 2 недели. Мышам контрольной группы вводили физиологический раствор в те же сроки. Антигены и адьюванты, использованные

для иммунизации мышей в группах I–VII, приведены в табл. 1. Иммунный ответ оценивали через 10 сут после второй иммунизации.

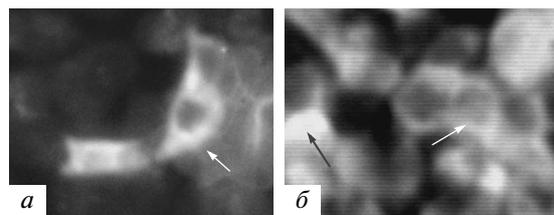
**Оценка иммунного ответа. Гуморальный ответ.** Активность взаимодействия антител к белку NS3 в сыворотках крови мышей с rNS3 определяли методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА), как описано ранее [18]. 96-луночные планшеты (“Nunc”, Дания) сенсibilizировали описанными выше рекомбинантными белками rNS3, взятыми в фосфатно-солевом буфере в концентрации 1–3 мкг/мл. В качестве вторичных антител использовали козы антитела к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (“Сорбент”, Россия), а в качестве субстрата пероксидазы – тетраметилбензидин (“Sigma”, США); оптическую плотность измеряли в двухволновом режиме 450/620 нм. За титр сывороток с данным антигеном в ИФА принимали предельное разведение сыворотки крови, при котором значение оптической плотности при  $A_{450/620}$  в 2 раза превышало значение для контрольного образца (сыворотка крови неиммунизированных мышей).

Соотношение анти-NS3 антител подтипов IgG1 и IgG2a определяли в ИФА с использованием (в качестве вторичных антител) специфичных к Ig мыши антител подтипов IgG1 и IgG2a, конъюгированных с пероксидазой хрена (“Jackson Immunoresearch Laboratories”, США).

**T-клеточный ответ *in vitro*** оценивали в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) по секреции цитокинов IFN- $\gamma$  и IL-2, а также методом ELISpot. Клетки селезенки от 5 мышей каждой экспериментальной группы объединяли и выделяли фракцию мононуклеарных клеток, как описано ранее [17, 18]. Анализ клеточных реакций проводили в трех повторах. Для стимуляции спленоцитов *in vitro* использовали вышеперечисленные варианты rNS3 в конечной концентрации 1 мкг/мл. Положительным контролем служили культуры спленоцитов, активированные конканавалином А (ConA; 5 мкг/мл). В качестве отрицательных контролей использовали: 1) нестимулированные клеточные культуры из селезенок

**Таблица 1.** Антигены и адьюванты, использованные для иммунизации мышей

Группа мышей	Антиген – белок rNS3_1192-1459, мкг/мышь	Адьювант – суспензия Al(OH) <sub>3</sub> , мл/мышь	Антиген – плаزمида рсDNA-NS3, мкг/мышь	Адьювант – плазмида рсDNA-GM-CSF, мкг/мышь
I	2.5	0	0	0
II	2.5	0.05	0	0
III	0	0	100	0
IV	0	0	100	100
V	2.5	0	100	0
VI	2.5	0.05	100	100
VII	0	0	0	0



**Рис. 1.** Визуализация белка NS3 ВГС в клетках Vero, трансфицированных плазмидой pcDNA-NS3, методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител 2G12 (а) и 5B2 (б). Белыми стрелками обозначена цитоплазматическая локализация белка NS3, черными — ядерная. Увеличение в 400 раз.

мышей; 2) культуры, стимулированные неспецифическим антигеном — рекомбинантным белком NS4 ВГС, слитым с белком GST (“Диагностические системы”, Россия); 3) клеточные культуры из селезенок неиммунизированных мышей.

Для оценки влияния Трег на клеточный ответ в культуру спленоцитов наряду со стимуляторами добавляли моноклональные антитела к рецептору CD152 (CTLA-4) — 9H10 mAb (“eBioscience”, Великобритания).

**РБТЛ** выполняли, как описано ранее [17]. Индекс стимуляции пролиферации (ИСП) рассчитывали как отношение среднего количества лимфобластов в экспериментальных группах к среднему количеству лимфобластов в группе неиммунизированных мышей в присутствии тех же стимуляторов. Результат РБТЛ считали положительным при ИСП > 2.

**Измерение концентрации цитокинов** в культуральных жидкостях, полученных через 4 сут после стимуляции лимфоцитов, проводили методом ИФА с помощью коммерческих тест-систем для определения IFN- $\gamma$  и IL-2 (“Mabtech”, Швеция) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Концентрацию цитокинов определяли по калибровочным кривым стандартных образцов. Предел чувствительности для IFN- $\gamma$  составлял 2 пг/мл, а для IL-2 — 4 пг/мл.

**Определение IFN- $\gamma$ -секретирующих клеток методом ELISpot.** Количество клеток, секретирующих IFN- $\gamma$ , определяли с помощью тест-системы “ELISpot mouse IFN- $\gamma$ ” (“R&D systems”, США). Изолированные спленоциты ( $\sim 10^5$  клеток в лунке) инкубировали с иммобилизованными на 96-луночных планшетах mAb к IFN- $\gamma$  мыши в присутствии стимуляторов в течение 18 ч при 37°C в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub>. Окрашивание IFN- $\gamma$ -секретирующих клеток проводили в соответствии с рекомендациями фирмы: после инкубации клеток с биотинилированными анти-(IFN- $\gamma$ )-антителами добавляли стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой, и затем субстрат

фосфатазы BCIP/NBT. Окрашенные пятна (“spots”) детектировали визуально с помощью стереоскопического микроскопа МБС-10 (“ЛОМЗ”, Россия).

**Статистическую обработку результатов** проводили с использованием программы “Statistica 6”. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента; связь признаков определяли по коэффициенту линейной регрессии Пирсона; различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Трансфекция клеток Vero

На третьи сутки после трансфекции клеток Vero плазмидой pcDNA-NS3 полипептид NS3 выявляли с помощью флуоресцентной микроскопии. При использовании 2G12 mAb (рис. 1а) NS3 детектировали только в цитоплазме 2% клеток, в то же время 5B2 mAb окрашивали приблизительно 50% клеток как в цитоплазматической, так и в ядерной областях (рис. 1б). В случае интактных клеток Vero, обработанных в тех же условиях, окрашивания не наблюдали (результаты не представлены).

### Гуморальный иммунный ответ

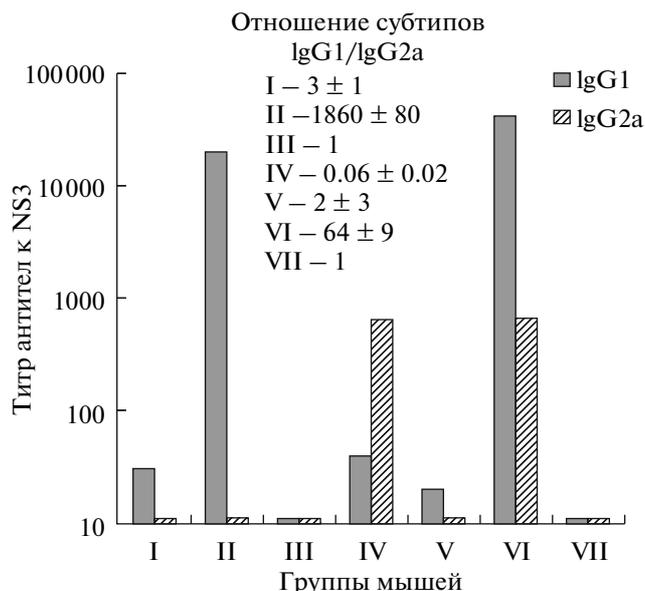
Результаты взаимодействия сывороточных антител с различными вариантами гNS3 в ИФА представлены в табл. 2. Титры связывания антител к гNS3 разного состава значительно различались как между группами иммунизированных мышей, так и внутри каждой группы. Наибольшей антигенной активностью обладали белки гNS3\_1192-1459 и гNS3\_1356-1459, наименьшей — протеазный домен NS3\_1027-1229. Высокий титр антител к NS3 (до 1 : 640000) индуцировал гNS3\_1192-1459, введенный с Al(OH)<sub>3</sub> (группа II). При совместной иммунизации мышей белком и плазмидой с адьювантами (группа VI) титр антител также был высоким — до 1 : 800000. Введение рекомбинантного белка и/или плазмиды pcDNA-NS3 без адьювантов (группы I, III, V) индуцировало слабый гуморальный ответ (титр антител  $\leq$  1 : 100). Инъекция pcDNA-NS3 совместно с pcDNA-GM-CSF вызывала увеличение активности антител до титра 1 : 640 (группа IV).

При изучении продукции антител подтипов IgG1 и IgG2a к белку NS3 установлено, что у мышей группы II (иммунизованы рекомбинантным белком) вырабатывались антитела исключительно подтипа IgG1, группы IV (иммунизованы ДНК NS3) — преимущественно IgG2a, группы VI (иммунизованы смесью этих конструкций) — антитела обоих подтипов с преобладанием IgG1 (рис. 2).

**Клеточный иммунный ответ**

Результаты РБТЛ свидетельствуют о том, что большинство исследованных нами вариантов рекомбинантных белков на основе NS3 способны стимулировать пролиферацию спленоцитов у мышей (рис. 3). Так, белок, содержащий протеазный домен NS3\_1027–1229, стимулировал пролиферацию лимфоцитов у мышей только III–VI групп. Сравнение значений ИСП в группах I и II с группами III и IV показывает, что введение мышам полипептидной последовательности NS3 индуцирует менее интенсивную пролиферацию лимфоцитов по сравнению с ДНК-иммунизацией ( $p < 0.05$ ). Совместное введение рекомбинантного белка и плазмиды статистически значимо ( $p < 0.01$ ) увеличивает пролиферацию спленоцитов (группы V и VI по сравнению с группами I–IV). Следует отметить, что использование адъювантов не приводит к существенному увеличению значения ИСП.

Содержание цитокинов в культуральных жидкостях спленоцитов, стимулированных четырьмя рекомбинантными белками NS3, приведено в табл. 3. В спленоцитах мышей групп I и II ни один из гNS3 не стимулировал выработку исследуемых цитокинов. Похожая картина наблюдалась у мышей, получивших инъекцию рсDNA-NS3 без адъюванта (за исключением синтеза IL-2 в ответ на стимуляцию полноразмерным белком NS3\_1027-1658). У мышей группы V отмечена секреция IL-2 в ответ на стимуляцию тремя гNS3: NS3\_1356-1459, NS3\_1192-1459 и NS3\_1027-1658. При введении мышам плазмиды с адъювантом (IV группа) и совместном ее введении с белком (VI группа) уровень цитокинов возрастал. IFN- $\gamma$  в концентрации 2–8 пг/мл вырабатывался при стимуляции спленоцитов всеми рекомбинантами



**Рис. 2.** Содержание антител подтипов IgG1 и IgG2a к белку NS3 у мышей, иммунизированных белковыми и ДНК-конструкциями на основе NS3 ВГС. По оси абсцисс – группы мышей (в соответствии с обозначениями в табл. 1); по оси ординат – титр антител к рекомбинантному белку NS3\_1027-1658 (по результатам ИФА).

NS3, кроме протеазного домена NS3\_1027–1229. IL-2 синтезировался лимфоцитами этих мышей в ответ на стимуляцию любым из гNS3 (4–27 пг/мл). В контрольной группе мышей полипептиды гNS3 не стимулировали секрецию цитокинов.

Анализ количества IFN- $\gamma$ -секретирующих клеток методом ELISpot показал (табл. 3), что такие клетки появляются у мышей группы II (иммунизированы гNS3 с гидроокисью алюминия) в ответ на стимуляцию полноразмерным белком NS3,

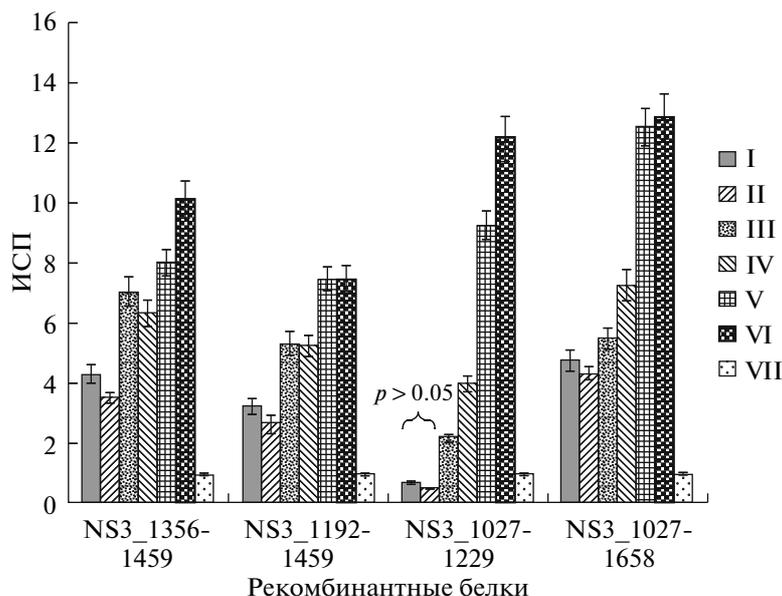
**Таблица 2.** Взаимодействие антител из сыворотки крови мышей с рекомбинантными NS3-полипептидами

Группа мышей <sup>а</sup>	Титр антител в ИФА с полипептидами <sup>б</sup> :				GST <sup>в</sup>
	NS3_1356-1459	NS3_1192-1459	NS3_1027-1229	NS3_1027-1658	
I	10	30	10	30	10
II	320000	640000	80	20480	1280
III	10	20	20	10	<10
IV	160	80	160	640	<10
V	10	100	20	20	20
VI	640000	800000	200	40960	320
VII	10	10	<10	<10	<10

<sup>а</sup> Соответствуют приведенным в табл. 1.

<sup>б</sup> Приведены максимальные разведения сывороток крови мышей, при которых в ИФА регистрируется взаимодействие антител с указанным антигеном.

<sup>в</sup> GST (глутатион-S-трансфераза) – белок, входящий в состав рекомбинантных белков, использован как неспецифический антиген.



**Рис. 3.** Реакция бласттрансформации лимфоцитов мышей, иммунизированных белковыми и ДНК-конструкциями на основе NS3 ВГС. Мышей в группах I–VII иммунизировали антигенами, указанными в табл. 1. Выделенные спленоциты культивировали в присутствии рекомбинантных NS3-полипептидов. По оси абсцисс указаны рекомбинантные NS3-полипептиды; по оси ординат приведены значения ИСП. Обозначены группы мышей, в которых значение ИСП не отличается от контрольной группы ( $p > 0.05$ ); значения ИСП для остальных групп статистически значимо отличаются от контроля ( $p < 0.05$ ).

у мышей групп III и IV (иммунизованы плазмидой) – на стимуляцию белком NS3\_1192-1459, в группе V (мыши иммунизованы гNS3 и плазмидой без адьювантов) – на стимуляцию любым из гNS3, кроме NS3\_1027–1229 (протеазный домен), в группе VI мышей (иммунизованы этими же конструкциями с адьювантами) – на все четыре рекомбинантных белка; в группах I (иммунизованы гNS3 без адьюванта) и VII (кон-

трольная) образования IFN- $\gamma$ -секретирующих клеток не обнаружено. При проведении всех описанных выше иммунологических реакций ConA использован в качестве положительного контроля. Максимальный клеточный ответ на ConA выявлен в селезенках мышей групп IV–VI (табл. 3). Следует отметить, что при статистическом анализе данных, представленных в табл. 3, установлена

**Таблица 3.** Продукция цитокинов IFN- $\gamma$  и IL-2 в ответ на стимуляцию спленоцитов мышей рекомбинантными NS3-полипептидами

Группа мышей <sup>а</sup>	Стимуляция спленоцитов <i>in vitro</i> полипептидами														
	NS3_1356-1459			NS3_1192-1459			NS3_1027-1229			NS3_1027-1658			ConA		
	IFN- $\gamma^b$	IL-2 <sup>б</sup>	IFN- $\gamma^b$	IFN- $\gamma^b$	IL-2 <sup>б</sup>	IFN- $\gamma^b$	IFN- $\gamma^b$	IL-2 <sup>б</sup>	IFN- $\gamma^b$	IFN- $\gamma^b$	IL-2 <sup>б</sup>	IFN- $\gamma^b$	IFN- $\gamma^b$	IL-2 <sup>б</sup>	IFN- $\gamma^b$
I	<2	<4	<20	<2	<4	<20	<2	<4	<20	<2	<4	<20	182	107	<20
II	<2	<4	<20	<2	<4	<20	<2	<4	<20	<2	<4	30	23	72	<20
III	<2	<4	<20	<2	<4	30	<2	<4	<20	<2	5	<20	353	186	110
IV	2	4	<20	4	4	80	<2	4	<20	5	10	<20	811	222	510
V	<2	5	50	<2	5	60	<2	<4	<20	<2	12	80	878	117	650
VI	4	7	80	5	27	30	<2	5	70	8	17	50	829	117	170
VII	<2	<4	<20	<2	<4	<20	<2	<4	<20	<2	<4	<20	70	102	<20

<sup>а</sup>Соответствуют приведенным в табл. 1.

<sup>б</sup>Концентрации цитокинов (пг/мл) в культуральной жидкости стимулированных указанными NS3-полипептидами спленоцитов; приведены результаты ИФА.

<sup>в</sup>Количество окрашенных пятен, соответствующих количеству IFN- $\gamma$ -секретирующих клеток на  $10^6$  спленоцитов; приведены результаты ELISpot.

корреляция результатов определения IFN- $\gamma$  двумя методами: ELISpot и ИФА ( $r = 0.87$ ,  $p < 0.05$ ).

#### Инактивация регуляторных Т-клеток *in vitro*

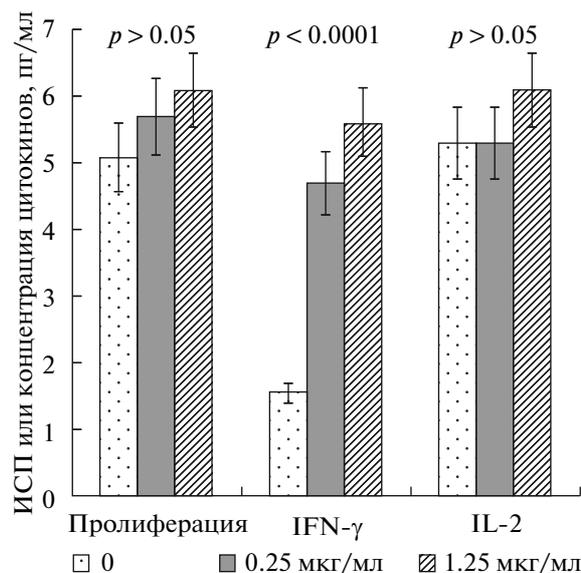
Одна из задач работы состояла в исследовании влияния клеток Treg на эффективность клеточного ответа при вакцинации, для чего использовали ингибиторный анализ. Моноклональные антитела 9H10 к рецептору Treg CTLA-4 (CD-152) вносили в лунки с культурой спленоцитов мышей, иммунизированных конструкциями на основе NS3, одновременно со стимуляторами. Рабочую концентрацию 9H10 mAb определили в предварительных экспериментах при стимуляции спленоцитов ConA. Оптимальная концентрация mAb находилась в диапазоне 0.2–3.0 мкг/мл. В тесте РБТЛ mAb, взятые в концентрации 0.25 мкг/мл, не оказывали влияния на пролиферацию, если же их концентрация составляла 1.25 мкг/мл, то значение ИСП увеличивалось на 10–41%, т.е. в среднем на 19% (рис. 4). Однако различия не были статистически значимыми ( $p = 0.2$ ). Аналогичная ситуация наблюдалась и при исследовании уровня секреции IL-2: превышение в среднем составляло 16%.

Статистически значимый эффект детектировали при изучении IFN- $\gamma$  в культурах лимфоцитов: Моноклональные антитела 9H10, в любой из вышеприведенных концентраций, индуцировали повышение уровня IFN- $\gamma$  в 2–5 раз ( $p < 0.0001$ ).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для изучения способности ДНК-конструкции экспрессировать ген NS3 ВГС в клетках млекопитающих проводили опыты по трансфекции эукариотических клеток Vero, детектируя в трансфицированных клетках белок NS3 по окрашиванию специфическими mAb. NS3 преимущественно локализовался в цитоплазматической области, но иногда и в ядерной части клетки. В трансфицированных клетках 5B2 mAb работали гораздо эффективней, чем 2G12 mAb. Эти антитела направлены к разным антигенным детерминантам белка NS3 [14], которые, по-видимому, по-разному экспонированы на поверхности белка. Следует отметить, что 5B2 mAb более активно реагировали с белком NS3 также в клетках печени больных гепатитом С [19].

Представляло интерес сравнить иммуногенную активность трех кандидатных вакцин: 1) рекомбинантного белка rNS3\_1192-1459, 2) ДНК-вакцины, содержащей полноразмерный ген NS3, а также 3) сочетания этих конструкций. Для оценки интенсивности гуморального и клеточного ответа на эти конструкции использовали четыре рекомбинантных белка, содержащих разные аминокислотные последовательности NS3. При



**Рис. 4.** Влияние моноклональных антител, специфичных к рецептору регуляторных Т-клеток, на пролиферацию лимфоцитов, стимулированных рекомбинантными NS3-белками, и секрецию цитокинов. Спленоциты культивировали в присутствии рекомбинантных NS3-белков с добавлением анти-CTLA-4 антител 9H10 в указанных концентрациях. По вертикали: слева приведены значения ИСП или концентрации цитокинов IFN- $\gamma$  и IL-2 (пг/мл). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  ошибка среднего значения. Различия считаются значимыми при  $p < 0.05$ .

изучении гуморального ответа установлено, что иммунизация мышей белком rNS3\_1192-1459 и плазмидой pcDNA-NS3 без адьювантов (группы I, III и V) слабо индуцирует В-клеточный ответ – титр антител не превышал 1 : 100. При введении белка NS3 вместе с Al(OH)<sub>3</sub> уровень антител повышался многократно (до 30000 раз). При этом наиболее активно антитела из сывороток крови иммунизированных мышей взаимодействовали с белками NS3\_1192-1459 и NS3\_1356-1459 – титры достигали 1 : (6  $\times$  10<sup>5</sup>). По данным ИФА, активность антител по отношению к полноразмерному рекомбинантному белку NS3\_1027-1658 в 15–30 раз ниже, чем к фрагментам NS3. Это позволяет предположить, что экспонированность антигена в области 1192–1459 различна в рекомбинантных белках NS3\_1192-1459 (использован для иммунизации мышей) и NS3\_1027-1658 (полноразмерный NS3). Антитела к протеазному домену NS3\_1027-1229 обнаружены в низких титрах, что может быть связано с незначительной областью перекрытия между полипептидами, использованными для иммунизации мышей и при детекции антител (всего 37 общих аминокислотных остатков в позициях 1192–1229). В то же время известно, что при естественном инфицировании

ВГС гуморальный ответ к домену сериновой протеазы практически отсутствует, а это свидетельствует о его низкой иммуногенности [20]. Следует отметить, что в большинстве исследований по разработке вакцин высокой иммуногенной активности рекомбинантных NS3 ВГС достигали за счет введения их в высоких дозах: 10–40 мкг/мышь [21–23]. Полученные нами ранее результаты хорошо согласуются с этими данными: так, при введении мышам 20 мкг белка NS3\_1356-1459 титр антител составлял  $1 : 10^8$  [14]. Полагая, что одна из приоритетных задач вакцинологии состоит в снижении концентрации препаратов, предназначенных для введения в качестве вакцины, мы снизили количество антигена в 8 раз – до 2.5 мкг/мышь. Впервые показано, что рекомбинантный белок NS3 обладает высоким иммуногенным потенциалом даже в низких дозах – при условии введения его с адьювантом.

Клеточный ответ оценивали по уровню пролиферации лимфоцитов, секреции цитокинов и их внутриклеточному содержанию. Рекомбинантный белок NS3\_1192-1459 индуцировал слабый Т-клеточный ответ, при этом добавление гидроксида алюминия не приводило к его усилению.  $Al(OH)_3$  входит в состав многих вакцин в качестве адьюванта. Нами впервые показано, что при иммунизации рекомбинантными белками ВГС данный адьювант – не лучший выбор. Отсутствие стимулирующего действия  $Al(OH)_3$  на клеточный ответ, который имеет решающее значение при гепатите С, ставит под сомнение целесообразность его использования при разработке вакцины. Это указывает на необходимость использования адьювантов другого состава, например, иммуномакса, который оказался эффективным иммуностимулятором при иммунизации рекомбинантным белком NS5A [24].

Плазмида pcDNA-NS3 без адьюванта стимулировала, в основном, только пролиферацию спленоцитов, продукция цитокинов оказалась слабой; эти результаты в целом согласуются с данными, полученными ранее при использовании той же плазмиды [12]. При введении ДНК NS3 в смеси с ДНК гена цитокина GM-CSF секреция IFN- $\gamma$  и IL-2 усиливалась, причем статистически значимо. Следует отметить, что ген GM-CSF оказался наиболее эффективным адьювантом по сравнению с двумя другими иммуномодуляторами: иммуномаксом и ликопидом (данные не представлены).

Сравнение иммуногенности NS3-конструкций показало, что наиболее интенсивный иммунный ответ получен при одновременном введении NS3-белка и NS3-ДНК с адьювантами. При этом достигнут не только высокий уровень пролиферации лимфоцитов, но и усиление их функциональной активности, которое проявлялось в накопле-

нии IFN- $\gamma$ -секретирующих клеток и продукции провоспалительных цитокинов в ответ на стимуляцию любым из исследованных rNS3. Интересно, что использование такой вакцинной композиции приводило к внутриклеточной экспрессии IFN- $\gamma$  в ответ на полипептиды NS3\_1356-1459 и NS3\_1027-1229, которые не были эффективными стимуляторами в группах мышей, иммунизированных либо только полипептидом, либо только ДНК. Кроме того, при совместной иммунизации данными конструкциями уровень антител обоих подтипов: IgG1 и IgG2a – был максимально высоким. В нескольких исследованиях на модели структурных белков ВГС: core, E1 и E2 [25, 26], – а также неструктурного белка NS5A [18] показано, что использование комбинации иммуногенов нуклеотидной и белковой природы более эффективно по сравнению с использованием индивидуальных компонентов ВГС. Для конструкций на основе NS3 такие данные получены впервые. Можно предположить, что комплекс антигенно-активных продуктов разной природы (ДНК и белки), взаимодействующих с различными Toll-подобными рецепторами, способен индуцировать мультиспецифичный иммунный ответ, имитирующий ответ организма на заражение вирусом.

Один из способов усиления иммунного ответа при вакцинации может состоять в блокировке клеток-супрессоров Treg – особой популяции лимфоцитов, основная функция которых состоит в ограничении чрезмерного иммунного ответа на чужеродные антигены и в предотвращении аутоиммунных реакций. Роль Treg при гепатите С изучена недостаточно. С одной стороны, у больных гепатитом С наблюдается значительное увеличение популяций Treg с маркерами CTLA-4 и FoxP3, которые могут тормозить развитие иммунного ответа по Th1-типу [27, 28]. Предполагается, что увеличение их количества препятствует элиминации ВГС [29]. С другой стороны, избыточное накопление Treg в печени больных хроническим гепатитом С ограничивало развитие фиброза печени [30]. В связи с этим особого внимания заслуживает продемонстрированная нами *in vitro* принципиальная возможность усиления клеточного ответа на специфические антигены при добавлении анти-Treg-антител. Об усилении клеточного ответа судили по статистически значимому увеличению секреции IFN- $\gamma$  – одного из ключевых антивирусных цитокинов. Вполне возможно, что по результатам дополнительных исследований в состав вакцинного препарата будут включены компоненты, блокирующие функции Treg. Некоторые авторы полагают, что блокада Treg может стать перспективным направлением и в терапии гепатита С [31].

Авторы выражают благодарность к.б.н. В.В. Мохонову (ФГУ “НИИ вирусологии им. Д.И. Ива-

новского” Минздравсоцразвития России) за предоставление плазмиды pcDNA-NS3.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (проект №11-04-01594).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Albeldawi M., Ruiz-Rodriguez E., Carey W.D. 2010. Hepatitis C virus: Prevention, screening, and interpretation of assays. *Cleve Clin. J. Med.* **77**, 616–626.
- Sharma S.D. 2010. Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options. *Indian J. Med. Res.* **131**, 17–34.
- Aberle J.H., Formann E., Steindl-Munda P., et al. 2006. Prospective study of viral clearance and CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C primary infection and reinfection. *J. Clin. Virol.* **36**, 24–31.
- Schulze zur Wiesch J., Lauer G., Day C., et al. 2005. Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J. Immunol.* **175**, 3603–3613.
- Thimme R., Neumann-Haefelin C., Boettler T., Blum H.E. 2008. Adaptive immune responses to hepatitis C virus: from viral immunobiology to a vaccine. *Biol. Chem.* **389**, 457–467.
- Yerly D., Heckerman D., Allen T.M., et al. 2008. Increased cytotoxic T-lymphocyte epitope variant cross-recognition and functional avidity are associated with hepatitis C virus clearance. *J. Virol.* **82**, 3147–3153.
- Cox A.L., Mosbrugger T., Lauer G.M., et al. 2005. Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology.* **42**, 104–112.
- Houghton M., Abrignani S. 2005. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature.* **436**, 961–966.
- Encke J., Radunz W., Eisenbach C., et al. 2007. Development of a heterologous, multigenotype vaccine against hepatitis C virus infection. *Europ. J. Clin. Invest.* **37**, 396–406.
- Encke J., Bernardin J., Geib J., et al. 2006. Genetic vaccination with Flt3-L and GM-CSF as adjuvants: Enhancement of cellular and humoral immune responses that results in protective immunity in a murine model of hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* **12**, 7118–7125.
- Matsui M., Moriya O., Belladonna M.L., et al. 2004. Adjuvant activities of novel cytokines, interleukin-23 (IL-23) and IL-27, for induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T Lymphocytes in HLA-A\*0201 transgenic mice. *J. Virol.* **78**, 9093–9104.
- Isagulians M.G., Petrakova N.V., Mokhonov V.V., et al. 2003. DNA immunization efficiently targets conserved functional domains of protease and ATPase/helicase of nonstructural 3 protein (NS3) of human hepatitis C virus. *Immunol. Lett.* **88**, 1–13.
- Козлов А.Ю., Климова Р.Р., Шингарова Л.Н., и др. 2005. Сравнительный анализ адьювантных свойств глюкозаминил-мурамилдипептида и гена гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора при ДНК-иммунизации против вируса простого герпеса. *Молекуляр. биология.* **39**, 504–512.
- Абдулмеджидова А.Г., Масалова О.В., Атанадзе С.Н., и др. 2002. Характеристика панели моноклональных антител к рекомбинантному белку NS3 вируса гепатита С. *Вопр. вирусологии.* **47**, 21–25.
- Муковня А.В., Туницкая В.Л., Хандажинская А.Л., Голубева Н.А., Закирова Н.Ф., Иванов А.В., Куханова М.К., Кочетков С.Н. 2008. Хеликаза/NTРаза вируса гепатита С. Эффективная система экспрессии и новые ингибиторы. *Биохимия.* **73**, 822–832.
- Ivanov A.V., Korovina A.N., Tunitskaya V.L., Kostyuk D.A., Rechinsky V.O., Kukhanova M.K., Kochetkov S.N. 2006. Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus non-structural NS5B and NS5A proteins. *Prot. Exp. Purif.* **48**, 14–23.
- Масалова О.В., Леснова Е.И., Грабовецкий В.В., и др. 2010. ДНК-иммунизация плазмидой, содержащей ген белка NS5A вируса гепатита С, индуцирует эффективный клеточный иммунный ответ. *Молекуляр. биология.* **44**, 275–283.
- Masalova O.V., Lesnova E.I., Pichugin A.V., et al. 2010. The successful immune response against hepatitis C nonstructural protein 5A (NS5A) requires heterologous DNA/protein immunization. *Vaccine.* **28**, 1987–1996.
- Масалова О.В., Куш А.А. 2003. Моноклональные антитела к белкам вируса гепатита С – инструмент для картирования антигенных детерминант, диагностики гепатита С и изучения вирусного патогенеза. *Российский биотерапевтический журнал.* **2**, 7–24.
- Chen M., Sallberg M., Sonnerborg A., et al. 1998. Human and murine antibody recognition is focused on the ATP/helicase, but not the protease domain of hepatitis C virus nonstructural 3 protein. *Hepatology.* **28**, 219–224.
- Lazdina U., Hultgren C., Frelin L., et al. 2001. Humoral and CD4(+) T helper (Th) cell responses to the hepatitis C virus non-structural 3 (NS3) protein: NS3 primes Th1-like responses more effectively as a DNA-based immunogen than as a recombinant protein. *J. Gen. Virol.* **82**, 1299–1308.
- Qiu Q., Wang R., Jiao X., et al. 2008. Induction of multispecific Th-1 type immune response against HCV in mice by protein immunization using CpG and Montanide ISA 720 as adjuvants. *Vaccine.* **26**, 5527–5534.
- Vajdy M., Selby M., Medina-Selby A., et al. 2006. Hepatitis C virus polyprotein vaccine formulations capable of inducing broad antibody and cellular immune responses. *J. Gen. Virol.* **87**, 2253–2262.
- Масалова О.В., Леснова Е.И., Пичугин А.В., и др. 2008. Исследование иммуногенности ковалентных конъюгатов неструктурных белков вируса гепатита С с иммуномаксом. *Иммунология.* **29**, 338–345.

25. Alvarez-Lajonchere L., Shoukry N.H., Gra B., et al. 2009. Immunogenicity of CIGB-230, a therapeutic DNA vaccine preparation, in HCV-chronically infected individuals in a Phase I clinical trial. *J. Viral. Hepatitis*. **16**, 156–167.
26. Ghorbani M., Nass T., Azizi A., Soare C., Aucoin S., Giulivi A., Anderson D.E., Diaz-Mitoma F. 2005. Comparison of antibody- and cell-mediated immune responses after intramuscular hepatitis C immunizations of BALB/c mice. *Viral Immunol.* **18**, 637–648.
27. Boettler T., Spangenberg H.C., Neumann-Haefelin C., et al. 2005. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J. Virol.* **79**, 7860–7867.
28. Rushbrook S., Ward S., Unitt E., et al. 2005. Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection. *J. Virol.* **79**, 7852–7859.
29. Cabrera R. 2004. An immunomodulatory role for CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. **40**, 1062–1071.
30. Claassen M.A., de Knegt R.J., Tilanus H.W., et al. 2010. Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limit the extent of fibrosis. *J. Hepatol.* **52**, 315–321.
31. Nakamoto N., Cho H., Shaked A., et al. 2009. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog.* **5**, e1000313.