

На правах рукописи

Серёгин Сергей Викторович

**ОПТИМИЗАЦИЯ КОНСТРУКЦИЙ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК ДЛЯ
ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Кольцово – 2015

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки
«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Научный консультант
доктор биологических наук,

Бажан Сергей Иванович,
заведующий теоретическим отделом
ФБУН Государственного научного центра
вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Беклемишев Анатолий Борисович,
зав. лаб. генной инженерии ФГБУ «НИИ
биохимии» СО РАМН

доктор биологических наук,
доцент

Кочетов Алексей Владимирович,
зав. лаб. генной инженерии ФГБНУ ФИЦ
«Институт цитологии и генетики»
СО РАН

доктор биологических наук,
профессор

Шестопалов Александр Михайлович,
зав. лаб. экспериментального
моделирования и патогенеза
инфекционных заболеваний ФГБНУ
«НИИ экспериментальной и клинической
медицины»

Ведущая организация:

ФГБНУ «Научно-исследовательский
институт молекулярной биологии и
биофизики» СО РАМН

Защита состоится «__» _____ 2015 г. в _____ часов на заседании
диссертационного совета Д 208.020.01 при ФБУН «Государственный
научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» по адресу: 630559,
р.п. Кольцово, Новосибирского района, Новосибирской обл.,
тел. (383)336-74-28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте
Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»
<http://www.vector.nsc.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

В.А. Белявская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Бурное развитие новых направлений биологической и химической науки, сформировавшихся в середине XX века, таких как молекулярная биология, молекулярная генетика и биохимия, в частности энзимология, стали залогом формирования новых, совершенно уникальных, технологий создания рекомбинантных молекул ДНК. Именно эти технологии и привели к формированию нового направления современной биологии, без которого сейчас невозможно представить дальнейшее развитие биологических наук в целом, – генетической инженерии. Суть данной технологии состоит в получении искусственных молекул ДНК путем их химико-ферментативного синтеза и/или соединения (рекомбинации) уже существующих фрагментов ДНК из различных источников *in vitro* с последующим введением полученных рекомбинантных молекул в живые клетки с целью выражения, или экспрессии, генетического материала в виде белковых молекул.

Совершенствование методов генетической инженерии открыло поистине безграничные горизонты развития современной биологии. Наиболее яркими примерами успехов и достижений этого направления, помимо создания целенаправленно генетически модифицированных различных живых организмов, можно считать получение ряда биологически активных веществ (БАВ) в рекомбинантном виде. Это, прежде всего, гормоны и цитокины, такие как интерлейкины и интерфероны, которые обеспечивают согласованность действия различных систем организма человека – иммунной, эндокринной, нервной, лимфатической, сердечно-сосудистой, пищеварительной, репродуктивной – как в нормальных, так и в патологических условиях. Поскольку выделение таких веществ из природных источников сопряжено с рядом объективных трудностей и рисков и зачастую совершенно неэффективно, их получение в рекомбинантном виде является единственно возможным способом создания на их основе новых диагностических и профилактических препаратов, а также лекарственных средств.

Получение различных БАВ в рекомбинантном виде напрямую связано с разработкой новых и усовершенствованием существующих систем клонирования и экспрессии генетического материала, разработкой эффективных методов выделения целевых белковых продуктов из клеток штаммов-продуцентов.

Таким образом, в данной работе решалась задача создания надежных экспрессионных векторных плазмид и их использования для получения ряда бактериальных штаммов-продуцентов белков-иммуномодуляторов различного происхождения, перспективных для нужд современной медицины.

Отсутствие эффективных противовирусных препаратов оставляет вакцинопрофилактику единственным специфическим средством сдерживания некоторых опасных вирусных инфекционных заболеваний, к которым можно отнести синдром приобретенного иммунодефицита, вызываемого вирусами иммунодефицита человека (ВИЧ/СПИД), и Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ), вызываемой одноименным вирусом. В то же время, эффективные и безопасные вакцинные препараты против этих опаснейших инфекций до сих пор не разработаны, что предопределяет огромную актуальность научных исследований, проводимых в этом направлении.

Перспективным решением поставленной задачи следует признать использование ДНК-вакцин – новейшего подхода к вакцинопрофилактике

вирусных инфекционных заболеваний, базирующегося на достижениях генетической инженерии. При полной безопасности они способны индуцировать полноценный иммунный ответ против конкретного инфекционного агента. Определяющую роль в создании подобных препаратов вакцин нового поколения играет усовершенствование существующих и разработка новых генетических конструкций, на основе которых возможно провести получение рекомбинантных молекул ДНК, обладающих необходимыми свойствами, обеспечивающими надежную защиту от определенных вирусных инфекций.

Для разработки эффективных вакцин нового поколения совершенно необходимо обладать знаниями относительно генетического разнообразия того или иного инфекционного агента. Для этого целесообразно применять современные надежные методы его детекции и генотипирования. Если для ВИЧ такие методы уже разработаны и успешно применяются, то в случае ККГЛ на момент начала настоящей работы ощущалась острая нехватка надежных экспресс-методов обнаружения вируса (его компонентов или антител к нему) в биологических образцах, а работы по изучению генетического разнообразия только начинались.

Таким образом, настоящая работа была ориентирована на разработку подходов к созданию новых методов экспресс-диагностики и генотипирования вируса ККГЛ, а также на конструирование серии экспрессионных векторных плазмид с использованием широкого арсенала современных методов генетической инженерии и создание на их основе ряда рекомбинантных плазмидных ДНК, перспективных для разработки новых кандидатных ДНК-вакцин против ВИЧ/СПИД и ККГЛ.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось конструирование рекомбинантных векторных плазмид, обеспечивающих эффективность клонирования и экспрессии различных генов, получение на их основе оригинальных рекомбинантных плазмид, направляющих в бактериальных клетках эффективный синтез ряда природных, мутантных и химерных иммуномодуляторов; создание и оптимизация серии генетических конструкций, предназначенных для получения перспективных ДНК-вакцинных препаратов против ВИЧ/СПИД и ККГЛ, а также разработка современных методов экспресс-диагностики ККГЛ и генотипирования вируса ККГЛ в биологических образцах.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Сконструировать рекомбинантные плазмиды, обеспечивающие экспрессию генов интерлейкина-2 (IL-2) и его мутантных аналогов в клетках *Escherichia coli*.
2. На основе полученных плазмид сконструировать плазмидный вектор pRTU1, содержащий промотор гена *recA* *Proteus mirabilis*, *trpA*-терминатор *E. coli* и протяженный полилинкер, чтобы обеспечить удобство клонирования и высокий уровень экспрессии различных генов в клетках *E. coli*.
3. С использованием векторной плазмиды pRTU1 создать оригинальные рекомбинантные плазмиды, обеспечивающие в бактериальных клетках эффективный синтез ряда природных, мутантных и химерных иммуномодулирующих белков, в том числе: IL-2 человека и двух его мутантных аналогов; двух химерных белков ILA и AIL, состоящих из IL-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы; анафилатоксина C5a человека; ангиогенина человека; белка двух штаммов (высоковирулентного и

слабовирулентного) вируса натуральной оспы (ВНО), гомологичного рецептору γ -IFN человека.

4. Получить рекомбинантные плазмидные ДНК рВК-RSV-TCI и рсDNA-TCI, содержащие под контролем RSV- и CMV-промоторов искусственный ген TCI, кодирующий множественные CTL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1.
5. Создать серию векторных плазмид (рV1, рV2, рV3) на основе плазмиды рсDNA3.1/*myc*-His(-)/*lacZ*, обеспечивающих эффективное получение набора кандидатных ДНК-вакцин с целью сравнительного изучения некоторых аспектов их иммуногенного потенциала.
6. Сконструировать набор рекомбинантных плазмидных ДНК на основе векторов рV1, рV2, рV3, предназначенных для создания кандидатных ДНК-вакцинных препаратов против ВИЧ/СПИД и ККГЛ.
7. Разработать современные методы экспресс-диагностики ККГЛ и генотипирования вируса ККГЛ в биологических образцах.

Научная новизна и практическая ценность работы. В данной работе сконструированы оригинальные рекомбинантные векторные плазмиды, в том числе рRTU1, содержащие эффективные транскрипционные элементы и обеспечивающие клонирование и высокий уровень экспрессии различных генов в клетках *E. coli*. В вышеназванной плазмиде этот эффект достигается за счет наличия сильного индуцибельного промотора гена *recA* *Proteus mirabilis*, *trpA*-терминатора *E. coli* и расположенного между ними протяженного полилинкерного участка с большим набором уникальных сайтов узнавания для эндонуклеаз рестрикции.

С использованием векторной плазмиды рRTU1 созданы эффективные бактериальные штаммы-продуценты ряда природных, мутантных и химерных иммуномодулирующих белков, в том числе: IL-2 человека и двух его мутантных аналогов; двух химерных белков ILA и AIL, состоящих из IL-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы; анафилатоксина С5а человека; ангиогенина человека; белка вируса натуральной оспы (ВНО), гомологичного рецептору γ -IFN человека, двух штаммов – высоковирулентного и слабовирулентного. Причем химеротоксины ILA и AIL, а также вышеназванные белки ВНО получены и изучены впервые.

Сконструированная рекомбинантная плазида рсDNA-TCI, содержащая под контролем CMV-промотора искусственный ген TCI, кодирующий множественные CTL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1, является перспективным кандидатом для создания на ее основе ДНК-вакцинных препаратов. Данная генетическая конструкция в настоящее время активно и успешно используется в ГНЦ ВБ «Вектор» для разработки новых современных вакцин. Сама конструкция и созданные на ее основе вакцинопрофилактические препараты защищены тремя патентами РФ на изобретения.

Разработана и сконструирована серия оригинальных векторных плазмид (рV1, рV2, рV3), обеспечивающая эффективное получение набора кандидатных ДНК-вакцин с целью сравнительного изучения различных аспектов их иммуногенного потенциала.

Получен набор рекомбинантных плазмидных ДНК на основе векторов рV1, рV2, рV3, который предназначен для создания перспективных ДНК-вакцинных препаратов против ВИЧ/СПИД и ККГЛ. На основе этих конструкций в настоящее время в ГНЦ ВБ «Вектор» разрабатывается ДНК-вакцина против ККГЛ.

Разработаны современные методы экспресс-диагностики ККГЛ и генотипирования вируса ККГЛ в биологических образцах, основанные на ОТ-ПЦР и ПДРФ. Получен рекомбинантный нуклеокапсидный белок N различных штаммов вируса ККГЛ, который может быть успешно использован в диагностических тест-системах по обнаружению антигена вируса ККГЛ в клинических образцах методом ИФА и методом флуоресцирующих антител. Результаты работы в части ККГЛ защищены пятью патентами РФ на изобретения, тест-система по выявлению РНК вируса ККГЛ была запущена в производство в ЗАО «Вектор-Бест» (п. Кольцово, Новосибирская область).

Таким образом, в диссертационной работе изложены новые научно обоснованные генно-инженерные и биотехнологические решения, внедрение которых может внести значительный вклад в развитие страны, в частности, в области здравоохранения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Плазмидная ДНК pRTU1, содержащая каскету «промотор гена *recA* *P. mirabilis* – полилинкер – терминатор транскрипции *t_{trpA}* *E. coli*», обеспечивает клонирование и высокий уровень экспрессии различных генов в клетках *E. coli*.
2. Рекомбинантные плазмиды, полученные с использованием вектора pRTU1, направляют в бактериальных клетках эффективный синтез ряда природных, мутантных и химерных иммуномодулирующих белков, в том числе: IL-2 человека и двух его мутантных аналогов; двух химерных белков ILA и AIL, состоящих из IL-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы; белка вируса натуральной оспы, гомологичного рецептору γ -IFN человека, двух штаммов – высоковирулентного и слабовирулентного; анафилатоксина C5a человека; ангиогенина человека.
3. Рекомбинантная плазмидная ДНК pcDNA-TCI, содержащая искусственный ген TCI, кодирующий множественные CTL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1, является перспективным кандидатом для создания на ее основе ДНК-вакцинных препаратов.
4. Серия векторных плазмид (pV1, pV2, pV3) обеспечивает эффективное получение набора кандидатных ДНК-вакцин с целью сравнительного изучения влияния на их иммуногенность убиквитинзависимого процессинга целевых иммуногенов и презентации генерируемых эпитопов CD8+ Т-лимфоцитам по пути МНС-I класса.
5. Набор рекомбинантных плазмид, полученных на основе векторов pV1, pV2, pV3, состоящий из девяти плазмид, кодирующих структурные варианты полиэпитопных CTL-иммуногенов, обеспечивающих различные стратегии процессинга и презентации эпитопов ВИЧ-1, и трех плазмид, кодирующих структурные белки вируса ККГЛ (нуклеокапсидный белок N и зрелые поверхностные гликопротеины Gn и Gc), может быть использован для создания перспективных ДНК-вакцинных препаратов против ВИЧ-1 и ККГЛ.
6. Разработанные методы экспресс-диагностики ККГЛ и генотипирования вируса ККГЛ в биологических образцах, основанные на ОТ-ПЦР и ПДРФ, обеспечивают надежное обнаружение вирусной РНК и позволяют проводить первичное генотипирование различных биовариантов вируса ККГЛ.
7. Рекомбинантный нуклеокапсидный белок N может быть компонентом диагностических тест-систем по обнаружению антигена вируса ККГЛ в клинических образцах.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на следующих российских и международных конференциях и других научных мероприятиях: 2-я отраслевая конференция молодых ученых "Актуальные проблемы биотехнологии", Кольцово, 25-27 апреля 1990 г.; Международная конференция "Оценка спонсируемых биологических исследований в России в новом тысячелетии", Новосибирск, ГНЦ ВБ "Вектор", 2-4 сентября 1999 г.; 7-я, 8-я и 10-я Международная Конференция "СПИД, РАК И РОДСТВЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ", Санкт Петербург, 24-28 мая 1998 г.; 19-24 мая 2000 г.; 26-31 мая 2002 г.; European Meeting on Viral Zoonoses, Сант-Рафаэль, Франция, 13-16 октября 2001 г.; XII Международный конгресс по вирусологии, Париж, Франция, 27 июля – 1 августа 2002 г.; 4-я Всероссийская научно-практическая конференция «Генодиагностика инфекционных заболеваний», Москва, 2002 г.; Международный междисциплинарный конгресс «Прогресс в фундаментальных и прикладных науках для здоровья человека», Судак, Крым, Украина, 10-21 июня 2004 г.; Международная конференция "Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний", "Сосновка", Новосибирская обл., 8-10 сентября 2004 г.; Российская научно-практическая конференция "Генодиагностика инфекционных болезней", «Сосновка», Новосибирская обл., 25-27 октября 2005 г.; 15-й Европейский Конгресс по клинической микробиологии и инфекционным болезням, Копенгаген, Дания, январь 2005 г.; Международная конференция, посвященная 80-летию академика Д. Г. Кнорре, Новосибирск, 30 июля – 3 августа 2006 г.; III Российская научная конференция с международным участием, Новосибирск, 27-29 сентября 2006 г.; Научно-практическая конференция "Арбовирусы и арбовирусные инфекции", Астрахань, 17-20 октября 2006 г.; Международное рабочее совещание "Статус исследования вакцин против ВИЧ/СПИД: перспективы и потенциал развития ВИЧ-вакцины", Санкт-Петербург, 1-2 июня 2007 г.; Международный симпозиум "HIV Vaccines: Progress and Prospects", Банфф, Канада, 27 марта - 1 апреля 2008 г.; Вторая международная конференция по вопросам ВИЧ/СПИД в Восточной Европе и Центральной Азии (ЕЕСААС 2008), Москва, 3-5 мая 2008 г.; Международная научно-практическая конференция, посвященная 50-летию НИИ проблем биологической безопасности, Алматы, 19-21 мая 2008 г.; Международная конференция "AIDS Vaccine 2008", Кейптаун, ЮАР, 13-16 октября, 2008 г.; Рабочее совещание по рассмотрению хода выполнения распоряжения Правительства РФ от 25 декабря 2007 г. № 1905-р, Новосибирск, 20-21 февраля 2009 г.; XVIII Международная конференция по СПИД "AIDS 2010", Вена, Австрия, 18-23 июля, 2010 г.; 5-й Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням, Москва, 25-27 марта 2013 г.; XII International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, Веймар, Германия, 21–23 марта 2013 г.; 23-й Европейский конгресс по клинической микробиологии и инфекционным болезням, Берлин, Германия, 26 апреля – 2 мая 2013 г.; 15-й Международный конгресс по иммунологии (ICI), Милан, Италия, 22-27 августа 2013 г.; а также некоторых других.

По результатам работы опубликовано 35 научных статей в зарубежных и отечественных реферируемых и переводных журналах, рекомендованных ВАК, получено 8 патентов Российской Федерации на изобретения.

Вклад автора. Основная часть описанных в настоящей работе исследований проведена автором лично либо в соавторстве с коллегами. Рекомбинантная плазмида pRIL18, содержащая ген IL-2 под контролем *recA*-промотора

Proteus mirabilis, которая послужила основой для создания целевого экспрессионного вектора рRTU1, была любезно предоставлена нашим соавтором Камыниной Т.П.

Некоторые эксперименты по конструированию рекомбинантных плазмид, предназначенных для получения бактериальных штаммов-продуцентов иммуномодуляторов, проводились совместно с Бабкиной И.Н., Данилюк Н.К., Синяковым А.Н.

Генетические конструкции для создания кандидатных ДНК-вакцин получены совместно с Бабкиной И.Н., Белавиным П.А., Данилюк Н.К. в части вакцин против ВИЧ/СПИД и совместно с Бабкиной И.Н., Носаревой О.В., Пановой Т.А., Сафроновым П.Ф., Серegiной Е.В. в части вакцины против ККГЛ.

В работах по изучению генетического разнообразия вируса ККГЛ, на которых базируется разработка методов диагностики ККГЛ и генотипирования вируса, принимало участие большое количество сотрудников из разных стран и организаций - они перечислены в списке научных публикаций как соавторы. Непосредственно в разработке вышеназванных методов активное участие принимали Вышемирский О.И., Петрова И.Д., Серегин С.С., Яшина Л.Н., Meissner J.D. Работы по получению рекомбинантных белков вируса ККГЛ выполнены автором лично, часть из них - совместно с Серегиным С.С.

В разное время общее руководство отдельными этапами работы осуществляли: Бажан С.И., Петров В.С., Сандахчиев Л.С., Синяков А.Н., Щелкунов С.Н.

Структура и объем диссертации. Диссертация написана по классическому принципу и состоит из следующих разделов: список сокращений, общая характеристика работы, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список работ, опубликованных по теме диссертации, и список литературы (включает 532 источника, из которых 74 опубликованы в отечественных изданиях). Работа изложена на 311 страницах формата А4 (межстрочный интервал – 1,5; кегль шрифта – 13), содержит 65 рисунков и 11 таблиц, оформлена в соответствии с требованиями ГОСТ 7.32-2001 и ГОСТ 8.417-2002.

Благодарности. Работа выполнена в 1988-2014 годах в ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора в рамках научных тем организации и по грантам Государственных научно-технических программ: "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники, подраздел Защита от патогенов"; по Федеральной Государственной программе "Вакцины нового поколения и медицинские диагностические системы будущего"; в рамках Федеральной научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники гражданского назначения», подпрограмма ГНЦ РФ; по Федеральной Целевой программе "Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации" (2009-2014 гг.); по проекту МНТЦ №2153р "Дизайн, конструирование и биологическое тестирование ДНК-вакцины против ВИЧ-1, кодирующей множественные CTL-эпитопы ВИЧ-1".

На разных этапах выполнения работы в ней приняли участие многие сотрудники ГНЦ ВБ «Вектор» и других научных организаций России, а также коллабораторы из других стран, которым автор выражает свою признательность.

Все они являются соавторами научных публикаций и перечислены в списке публикаций автора.

Автор выражает искреннюю благодарность всем сотрудникам бывших структурных подразделений ГНЦ ВБ «Вектор»: отдел молекулярной биологии геномов (зав. отд. Щелкунов С.Н.), особенно сотрудникам лаборатории тонкого химического синтеза (зав. лаб. Синяков А.Н.), отдел биохимии вирусов (зав. отд. Малыгин Э.Г., Нетесова Н.А.), особенно сотрудникам лаборатории буньявирусов (зав. лаб. Петров В. С.), а также сотрудникам ЗАО «Вектор-Бест» Гришаеву М.П., Смердовой М.А., Гришаевой О.Н., Распопину В.В. за большую помощь в работе по тестированию образцов и внедрению в производство ОТ-ПЦР-тест-системы по выявлению РНК вируса ККГЛ.

Особую благодарность автор выражает:

Дымшицу Г.М. за безусловный преподавательский талант, предопределивший сферу научных интересов автора – молекулярная биология;

Сандахчиеву Л.С. за большую моральную поддержку в начале научного пути;

Синякову А.Н. за грамотное руководство в аспирантский период;

Щелкунову С.Н. и **Малыгину Э.Г.** за поддержку различных направлений исследований, общее руководство отдельными этапами работы и ценные советы;

Петрову В.С. за предоставленную возможность активно участвовать в научных проектах по изучению генетического разнообразия вирусов ККГЛ и краснухи;

Ильичеву А.А. и **Карпенко Л.И.** за огромную работу по организации комплекса мероприятий и научных исследований, направленных на доклинические и клинические испытания вакцин СалВИЧД и КомбиВИЧвак, в состав которых вошли рекомбинантные плазмидные ДНК, описанные в настоящей работе;

Бабкиной И.Н., Белавину П.А. и **Данилюк Н.К.** за многолетнее плодотворное и очень приятное сотрудничество и неоценимую помощь в проведении многих представленных в этой работе экспериментов по конструированию различных рекомбинантных ДНК.

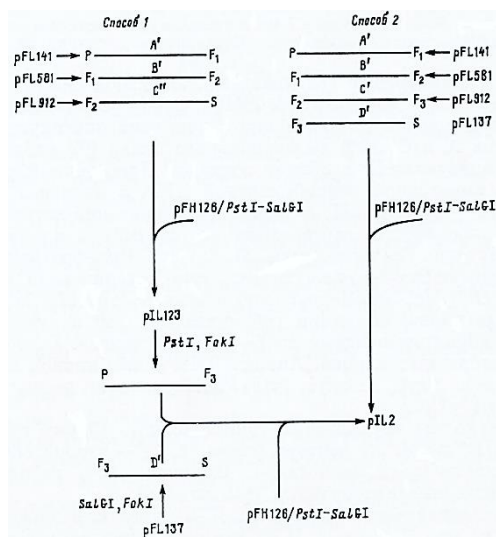
Глубочайшую признательность автор выражает своему научному консультанту **Бажану С. И.**, являющемуся организатором, вдохновителем и руководителем такого важного направления исследований и разработок, как создание кандидатных ДНК-вакцин, кодирующих полиэпитопные иммуногены, против ВИЧ/СПИД, в рамках которого была выполнена большая часть представленной работы.

Автор также благодарен коллегам, высказавшим замечания и предложения по оформлению диссертации: Белявской В.А., Гилевой И.П., Дейнеко Е.В., Ильичеву А.А., Колосовой И.В., Локтеву В.Б., Серегиной Е.В., Щелкунову С.Н.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Конструирование рекомбинантных плазмид, обеспечивающих экспрессию гена интерлейкина-2 (IL-2) человека и его мутантных аналогов в клетках *Escherichia coli*. Начало настоящей работе было положено в 1987 году как логическое продолжение ранее выполненных работ по химико-ферментативному синтезу гена IL-2 человека, кодирующему один из ключевых полифункциональных медиаторов иммунной системы (рис. 1). Известный как фактор роста Т-лимфоцитов, он играет важную роль в развитии Т-клеточного иммунного ответа организма, в том числе в развитии реакции отторжения аллотрансплантата.

К тому времени было известно, что одним из важных районов, отвечающих за



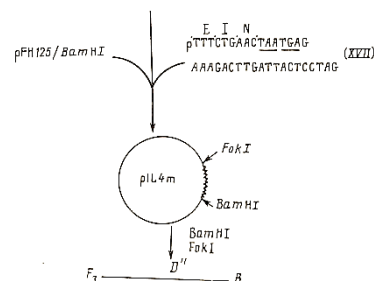
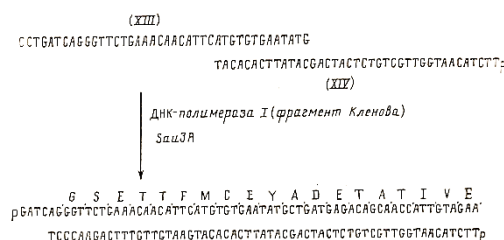
проявление биологической активности IL-2, является С-концевой участок молекулы со 120 по 133 а/к. Делеции и мутации в этом районе приводили к появлению биологически неактивных белков-аналогов IL-2, лигандные свойства которых еще не были исследованы. В случае сохранения способности связываться с рецептором к IL-2 у какого-либо из подобных аналогов он мог бы служить антагонистом IL-2 и найти применение в иммуносупрессивной терапии.

Рисунок 1 – Два способа сборки полной последовательности гена IL-2 человека

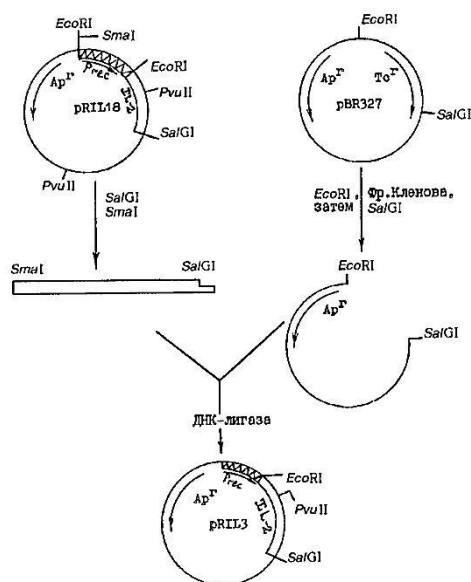
Было получено два таких мутантных гена: с делецией 120-133 а/к-сегмента (IL-2m) и с заменой Trp в положении 121 на Phe ((Phe¹²¹)-IL-2). На рисунке 1 представлено два способа сборки целевого гена IL-2 человека. Сборку мутантных генов IL-2 проводили первым способом, для чего вначале получали и клонировали С-концевые мутантные фрагменты методами химико-ферментативного синтеза (рис. 2) либо мутагенеза с помощью ПЦР.

Следующим этапом работы стало создание надежной и эффективной экспрессионной векторной системы для получения целевых белков – IL-2 и его мутантных аналогов – в рекомбинантном виде. Ряд традиционных подходов к решению этой задачи, предпринятых нами и нашими коллегами из других лабораторий, не увенчался успехом. Наиболее перспективной оказалась новая экспериментальная плазмидная конструкция pRIL18, полученная нашим коллегой Камыниной Т.П., которая содержит ген IL-2 человека под контролем регуляторной промоторно-операторной области гена *recA* *Proteus mirabilis*, но она не лишена ряда недостатков.

Рисунок 2 – Схема получения плазмиды pIL4m и нуклеотидные (соответствующие им а/к) последовательности олигомеров, составляющих целевой мутантный субфрагмент D'' гена IL-2m



На рисунке 3 показана схема реконструкции этой плазмиды, суть которой сводилась к замене векторной части экспрессирующей ген IL-2 плазмиды с pBR322 на pBR327. Тем самым удалялись нежелательные участки рестрикции в векторной части плазмиды и можно было ожидать проявления эффекта дозы гена, поскольку копияность плазмиды pBR327 существенно выше, чем pBR322. Кроме того, после подобной реконструкции ближайший к 3'-концу гена IL-2 терминатор транскрипции *t_s*, расположенный на расстоянии 2035 п.н. в плазмиде pRIL18, оказался существенно ближе к кодомам терминации трансляции этого гена (975 п.н.), что может способствовать более



эффективной экспрессии гена IL-2.

Так была получена целевая плазмида pRIL3, которая обеспечила в сравнении с плазмидой pRIL18 повышение уровня синтеза целевого белка в 1,5-2 раза (рис. 4) – около 30 мкг/мл бактериальной культуры. Замена гена IL-2 в этой плазмиде на ген (Phe¹²¹)-IL-2 привела к близкому уровню синтеза целевого рекомбинантного белка.

Рисунок 3 – Схема конструирования плазмиды pRIL3

Как можно видеть на рисунке 4а, уровень синтеза мутантного (Phe¹²¹)-IL-2, в клетках *E. coli* JM103(pRIL2s) был сравним с уровнем синтеза IL-2, обеспечиваемым плазмидой pRIL3.

Экспрессия гена IL-2m была достигнута аналогичным образом (рис. 4б).

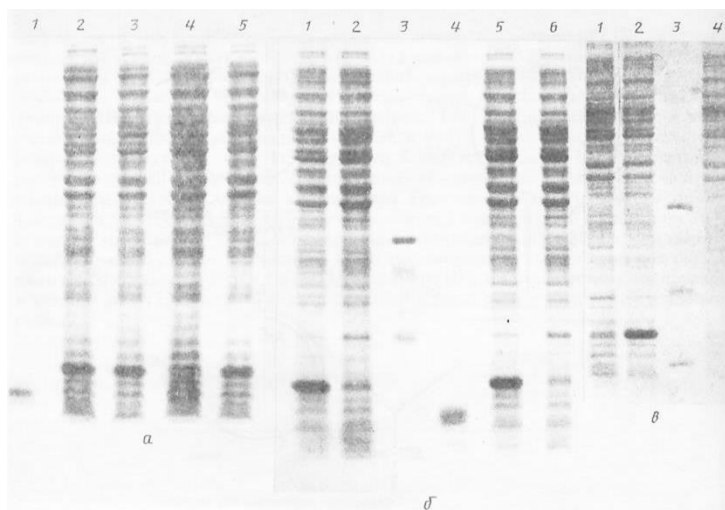
Однако следует отметить, что 3'-конец гена IL-2m фланкирован участком расщепления рестриктазой *Bam*HI, а не *Sal*I, как ген IL-2, поэтому при клонировании требовался коннектор для стыковки некомплементарных друг другу выступающих 5'-концов ДНК. В качестве такового нами был выбран участок полилинкерной области векторной плазмиды pFH123, который способен образовать в целевой плазмиде протяженную шпильчатую структуру вслед за геном IL-2m, напоминающую последовательности терминаторов транскрипции, зависящих от р-фактора, что могло привести к увеличению уровня экспрессии целевого гена (рис. 5).

Для получения рекомбинантной плазмиды pRIL2m в векторе pRIL3/*Pvu*II-*Sal*I клонировали *Pvu*II-*Eco*RI-фрагмент плазмиды pIL2m, содержащий ген IL-2m без первых 11 кодонов и участок полилинкера векторной плазмиды, совместно с полилинкерным *Eco*RI-*Sal*I-фрагментом плазмиды pFH123.

Тот факт, что наши ожидания оправдались – плазмида pRIL2m обеспечивала в клетках *E. coli* очень высокий уровень синтеза (около 55 мкг/мл бактериальной культуры) целевого белка – укрепил нас в мысли, что именно протяженный инвертированный повтор определяет повышение уровня синтеза. В самом деле, выполняет ли этот палиндром функцию терминатора транскрипции или, в противном случае, увеличивает стабильность образующейся информационной РНК, мы не беремся утверждать.

а: 1 – 14 кДа (маркер); 2 и 3 – pRIL2s (+); 4 – pRIL18 (+); 5 – pRIL3 (+);
б: 1 и 5 – pRIL2m (+); 2 и 6 – pRIL2m (-); 3 – 20, 24, 26 кДа; 4 – 14 кДа (маркеры);
в: 1 – pRIL18 (+); 2 – pRIL7t (+); 3 – 12, 20, 26 кДа; 4 – клетки без плазмиды; (+) – 3 ч индукция митомицином С; (-) – без индукции.

Рисунок 4 – Экспрессия гена IL-2 и его аналогов в клетках *E. coli* JM103, направляемая различными плазмидами. Электрофореграммы. 15 % ПААГ



приводит к повышению уровня синтеза соответствующих белков. Мы полагаем, что это происходит благодаря тому, что образующиеся шпилечные структуры выполняют функцию терминации транскрипции, в противном случае они могут обеспечивать повышенную стабильность мРНК, обуславливая тот же эффект.

На основе полученных генетических конструкций нами созданы бактериальные штаммы-продуценты человеческого IL-2, разработаны условия их культивирования, методы выделения целевого рекомбинантного белка из биомассы клеток продуцентов, написан и утвержден проект Инструкции по изготовлению и контролю «Интерлейкин-2 рекомбинантный человеческий (субстанция)» (ИК 103.ВК-1892.35-93 от 21.12.1993 г.).

Результаты экспериментов по биологическому тестированию показали, что мутантные аналоги IL-2 не обладают биологической активностью этого лимфокина (в то время как рекомбинантный IL-2 в полной мере проявляет активность природного лимфокина), но обладают приблизительно одинаковой небольшой способностью снижать Т-клеточный пролиферативный ответ на IL-2. Однако существенной блокады не происходит даже в случае 10-кратного превышения по концентрации любого из них над IL-2, а в сравнимых концентрациях они не оказывают практически никакого влияния на действие IL-2.

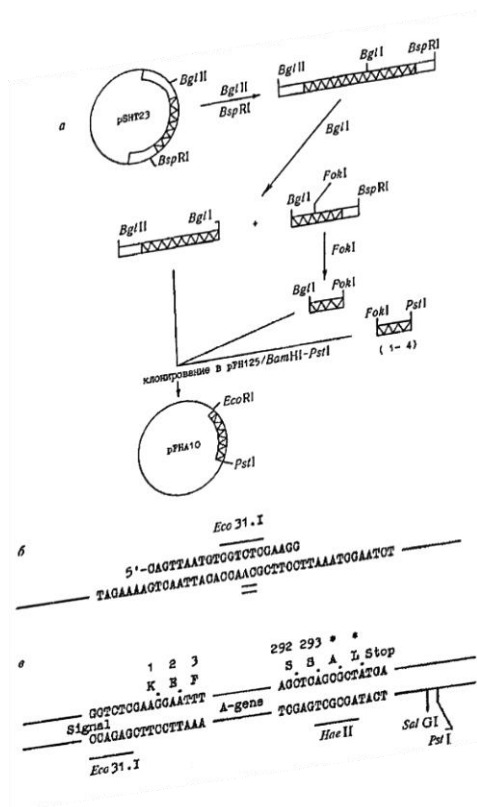
Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что мутантные белки не являются достаточно сильными антагонистами IL-2. Поэтому на следующем этапе было решено использовать иные методические и функциональные подходы.

Конструирование рекомбинантных плазмид, обеспечивающих синтез гибридных белков, состоящих из IL-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы. Одним из перспективных подходов может быть применение селективных химеротоксинов, представляющих собой химерные белки, состоящие из IL-2 человека и цитотоксического компонента. При этом очень важно, чтобы используемый токсин был лишен своей природной рецепторной части, функцию которой призвана выполнять интерлейкиновая часть химерной молекулы.

Мы приняли решение использовать токсин *Shigella dysenteriae* (шига-токсин), молекула которого состоит из одной цитотоксической А-субъединицы и пяти В-субъединиц, ответственных за связывание с рецептором. Механизм действия этого токсина заключается в ингибировании связывания аминоксил-тРНК с рибосомой, которое зависит от фактора элонгации трансляции EF1, что обусловлено расщеплением N-гликозидной связи аденинового основания в положении 4324 в 28S рибосомной РНК, входящей в состав большой субъединицы рибосомы.

Таким образом, следующим этапом работы являлось получение генов ILA и AIL, кодирующих химеротоксины, состоящие из IL-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы в различной последовательности, и получение целевых продуктов их экспрессии в клетках *E. coli*.

Для получения фрагмента ДНК, кодирующего цитотоксическую А-субъединицу шига-токсина (А-гена) использовали плазмиду pSHT23, несущую фрагмент генома *Sh. Dysenteriae* с опероном этого токсина, любезно предоставленную Козловым Ю.В. Общая схема получения представлена на рисунке 6. Как видно из рисунка, поэтапно, с использованием комбинации различных методов (рестриктазно-лигазный, химико-ферментативный,



олигонуклеотид-направленный мутагенез), была получена целевая плазида, содержащая все необходимые элементы для точной стыковки с геном IL-2.

Рисунок 6 – Конструирование плазмиды pFHA10: а – схема получения промежуточной плазмиды pFHA10; б – положение мутационного праймера на ДНК фага M13mp9A; в – строение фланкирующих А-ген районов в плазмиде pFHA10

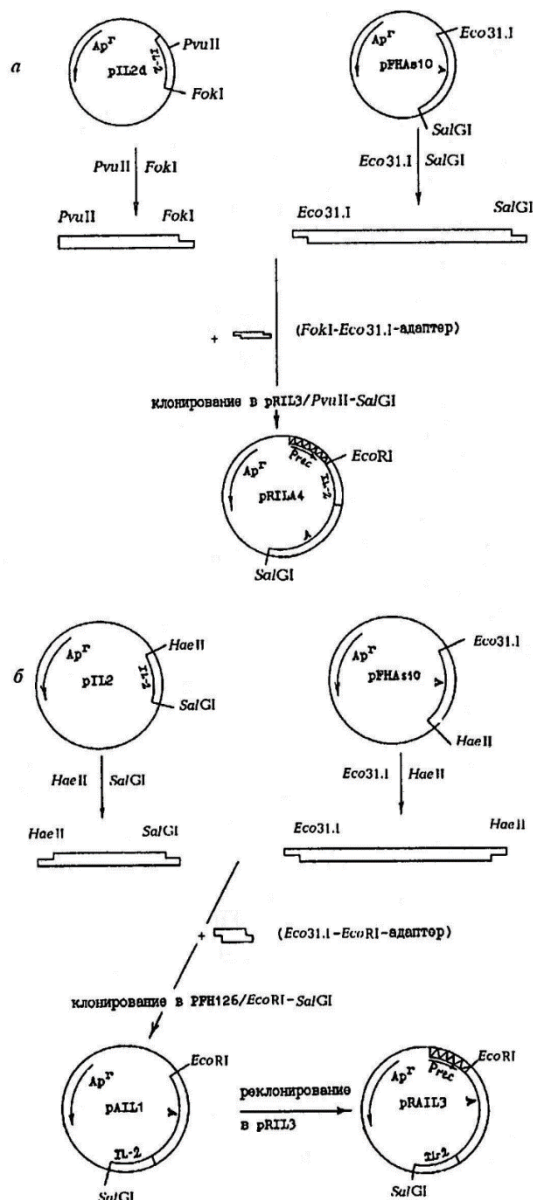
Общие схемы конструирования целевых рекомбинантных плазмид pRAIL3 и pRAIL4 представлены на рисунке 7.

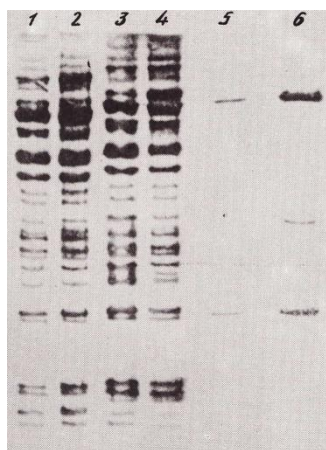
Обнаружение продуктов экспрессии химерных генов в клетках *E. coli* JM103

оказалось затруднено низким уровнем синтеза целевых химеротоксинов, однако использование штаммов с пониженной способностью к внутриклеточному протеолизу и результаты иммуноблоттинга как с моноклональными антителами к IL-2 человека, так и с сывороткой против шига-токсина, убедительно доказали наличие и иммуноспецифичность целевых продуктов экспрессии в лизатах бактериальных клеток (рис. 8 и 9). Уровень синтеза целевых химеротоксинов составил 5-6 мкг/мл (AIL) и до 30 мкг/мл (ILA).

Рисунок 7 – Схемы конструирования рекомбинантных плазмид pRAIL4 (а) и pRAIL3 (б)

В результате серии экспериментов по изучению биологической активности полученных нами химеротоксинов было установлено, что они способны ингибировать синтез белка в бесклеточной системе трансляции из ретикулоцитов кролика *in vitro*, что





свидетельствует о сохранении активности А-субъединицы шига-токсина в составе обеих химерных молекул (рис. 10).

1-4 – лизаты клеток *E.coli* VL1201, содержащих плазмиды: 1 – pRAIL3 (-), 2 – pRAIL3 (+), 3 – pRILA4 (-), 4 – pRILA4 (+); где (+) – 1 ч индукция митомицином С, (-) – без индукции; 5 и 6 – выделенные белки AIL и ILA соответственно.

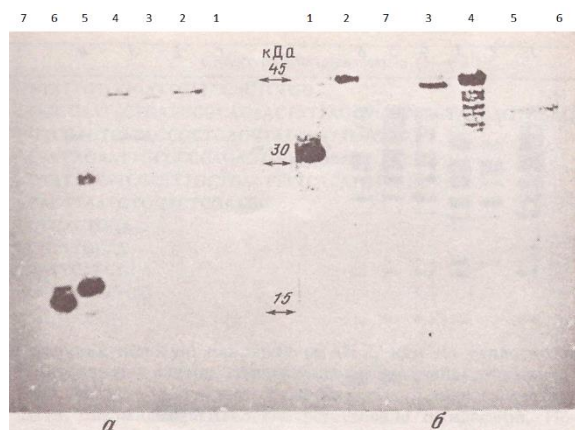
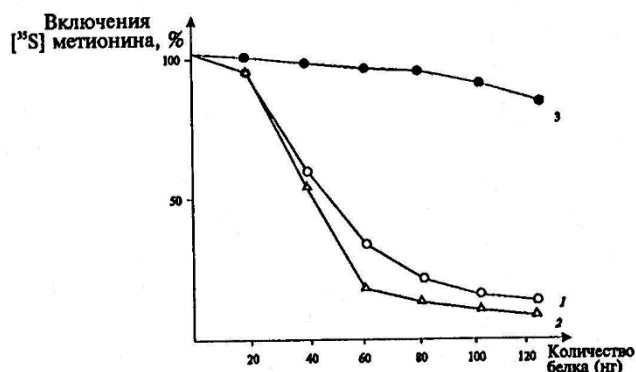
Рисунок 8 – Получение гибридных белков ILA и AIL. Электрофореграмма. 15 % ПААГ

а: связывание с моноклональными антителами к IL-2 человека;

б: связывание с сывороткой против токсина шигеллы.

1 – шига-токсин (очищенный, гомогенный); 2 – ILA (частично очищенный); 3 – AIL (лизат); 4 – ILA (лизат); 5 – IL-2m (лизат); 6 – IL-2 (лизат); 7 – отрицательный контроль (лизат клеток с плазмидой pBR327).

Рисунок 9 – Результаты иммуноблоттинга бактериальных клеточных лизатов, содержащих белки IL-2, IL-2m, ILA и AIL



1 – ILA;
2 – AIL;
3 – контрольный препарат *E. coli* VL1201(pRAIL3) без индукции.

Рисунок 10 – Ингибирование синтеза белка химеротоксинами ILA и AIL *in vitro* в бесклеточной системе трансляции из ретикулоцитов кролика

Также было показано, что при действии на Т-лимфоциты человека, выделенные из периферической крови здоровых доноров, химеротоксины проявляют в зависимости от концентрации две противоположно направленные активности, присущие составным частям химерных молекул. Наиболее выраженное угнетение пролиферации бласт-трансформированных Т-лимфоцитов наблюдалось при действии белка AIL в концентрации 10 мкг/мл. Можно полагать, что такие химеротоксины могут быть использованы в качестве иммуносупрессивного препарата, для чего потребуются более углубленное изучение их биологических свойств.

Таким образом, нами была продемонстрирована возможность успешной экспрессии гена IL-2 человека, а также ряда его мутантных и химерных аналогов, в составе рекомбинантных плазмид под контролем индуцибельного *recA*-промотора *P. mirabilis*. Полученные нами обнадеживающие результаты привели нас к мысли продолжить серию экспериментов по совершенствованию этой системы

экспрессии и в первую очередь проверить возможность достижения высоких уровней экспрессии других генов, кодирующих важные белки, в плане перспективности получения на их основе новых иммунобиологических препаратов.

Синтез, клонирование и экспрессия в клетках *E. coli* гена аналога анафилатоксина C5a человека. Одним из ключевых белков системы комплемента, играющих важную роль в развитии воспалительного процесса и в регуляции иммунного ответа, является анафилатоксин C5a. В отличие от другого ключевого анафилатоксина C3a, обладающего иммуносупрессорными свойствами, C5a, напротив, способен усиливать иммунный ответ организма. Активация системы комплемента классическим либо альтернативным путем приводит к различному соотношению между этими белками, что и влияет на развитие иммунологической реакции при аутоиммунных заболеваниях или при защите от бактериальных инфекций.

Анафилатоксин C5a вызывает направленную миграцию клеток крови (хемотаксис), которые обладают предпочтительной адгезией к эндотелию сосудистой стенки. Таким образом происходит локальное повышение проницаемости сосудистой стенки, отек ткани, накопление клеток крови в просвете сосуда, то есть типичная картина воспалительной реакции.

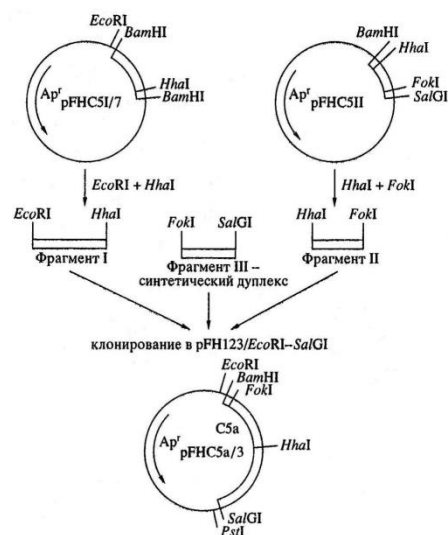
Высокая биологическая активность, присущая анафилатоксину C5a в процессе воспаления, предопределяет интерес исследователей к нему не только с научной точки зрения, но и представляет несомненный интерес для практической медицины.

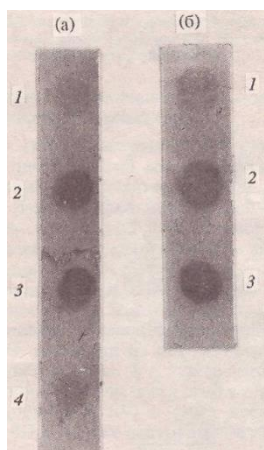
Целевой ген был получен нами в несколько стадий путем комбинирования различных способов химико-ферментативного синтеза генов с промежуточным клонированием и рестриктазно-лигазного метода (рис. 11) и клонирован под контроль *recA*-промотора путем замены гена IL-2 на целевой ген в составе рекомбинантной плазмиды pRIL3.

Штамм-продуцент рекомбинантного белка аналога C5a был получен путем трансформации бактериальных клеток *E. coli* VL1222. Условия культивирования и индукции синтеза целевого белка аналогичны описанным выше для IL-2 и его аналогов. Для оптимизации этих условий мы использовали дот-блоттинг (выявление проводили с помощью поликлональной козьей сыворотки к человеческому анафилатоксину C5a), поскольку для низкомолекулярных белков методом электрофореза клеточных лизатов это осуществить весьма затруднительно. Результаты приведены на рисунке 12.

Таким образом, было установлено, что максимальный выход белка наблюдается при 12 ч индукции митомицином C, и он составляет приблизительно 1 мкг/мл бактериальной культуры, хотя стоит отметить, что для таких коротких (74 а/к) полипептидов, каковым является анафилатоксин C5a, подобные уровни синтеза считаются вполне хорошими.

Рисунок 11 — Общая схема конструирования рекомбинантной плазмиды pFHC5a/3, содержащей ген аналога человеческого анафилатоксина C5a





Биологическая активность рекомбинантного аналога анафилатоксина C5a была подтверждена в тестах *in vitro*: клеточный хемотаксис и высвобождение пероксидаз из перитонеальных клеток (в основном, гранулоциты) крысы.

а – лизаты клеток *E. coli* VL1222(pRC5a), по 10 мкл на точку (сконцентрированы в 100 раз): 1 – в момент внесения индуктора митомицина С, 2, 3, 4 – 6, 12 и 18 ч индукции соответственно; б – человеческий C5a, выделенный из плазмы доноров: 1 – 0,25 мкг, 2 – 0,5 мкг, 3 – 1 мкг.

Рисунок 12 – Оценка уровня экспрессии рекомбинантного белка C5a методом радиоиммунного анализа. Радиоавтограф дот-блоттинга

Конструирование и проверка экспрессионной векторной плазмиды pRTU1. Успешное использование полученных нами и описанных выше рекомбинантных плазмид поставило задачу конструирования нового экспрессионного вектора, не только обладающего всеми достоинствами предшественников, но и предоставляющего новые возможности в плане проведения генно-инженерных манипуляций.

Во-первых, вместо конкретного гена мы приняли решение организовать протяженный полилинкер с уникальными участками узнавания для крупнощепящих эндонуклеаз рестрикции, который призван облегчить клонирование целевых генов. Во-вторых, логически напрашивалась замена созданного вслед за клонируемыми генами шпилечного участка, который по своей структуре очень напоминает р-зависимый терминатор транскрипции и в ряде случаев обеспечивает существенное повышение уровня экспрессии целевых генов, на настоящий аутентичный надежный терминатор транскрипции. Для этого было решено использовать сильный р-независимый терминатор транскрипции триптофанового оперона *E. coli* t_{trpA} .

Эта замена диктовалась еще и тем фактом, что шпилечный терминатороподобный участок сформирован из серии инвертированных сайтов узнавания для рестриктаз, и некоторые из них хотелось бы ввести в новый полилинкерный участок, где они должны быть уникальными.

Для решения этой задачи мы использовали плазмидный вектор pEZTZ318, который позволял извлечь фрагмент ДНК, содержащий необходимый полилинкер, вслед за которым расположен и требуемый терминатор транскрипции. *EcoRI-NruI*-фрагмент плазмиды pRIL7t (векторная часть) лигировали совместно с *EcoRI-EcoRV*-фрагментом плазмиды pEZTZ318 (содержит полилинкер и терминатор), и после трансформации клеток *E. coli* был отобран клон, несущий целевую рекомбинантную плазмиду, названную pRTU1. На рисунке 13 приведена схема данного плазмидного вектора.

Реклонировав в вектор pRTU1 гены IL-2, IL-2m, AIL и ILA, наблюдали уровни синтеза целевых белков, близкие к ранее полученным, тогда как в случае гена анафилатоксина C5a человека, мы наблюдали повышение уровня синтеза рекомбинантного белка в 1,5-2 раза по сравнению с прототипом, что составило 1,5-2 мкг/мл бактериальной культуры.

Таким образом, можно с уверенностью утверждать, что в дальнейшем целесообразно использовать плазмидный вектор pRTU1 для достижения высокого уровня экспрессии целевых генов. Именно такая задача и была поставлена на следующем этапе работы: проверить эффективность экспрессионной векторной плазмиды pRTU1 для получения различных чужеродных белков в клетках *E. coli*.

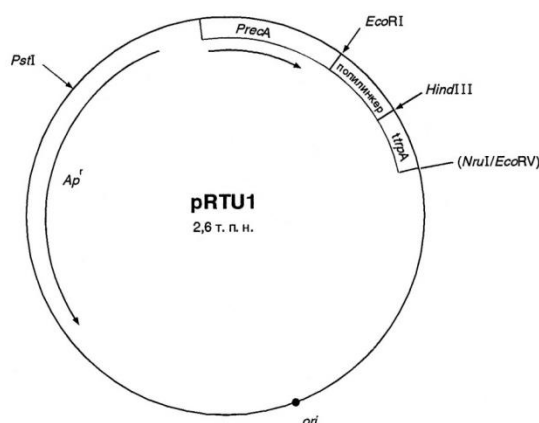
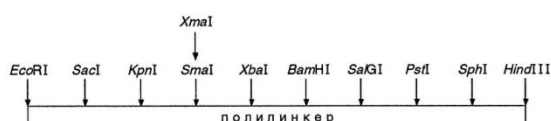


Рисунок 13 – Схема экспрессионной векторной плазмиды pRTU1



Получение белков вируса натуральной оспы, гомологичных рецептору γ -интерферона человека, в клетках *E. coli*. Изучение структурно-функциональной организации различных представителей ортопоксвирусов, проведение сравнительного анализа полученных результатов позволяет предсказывать некоторые функции белков, кодируемых теми или иными открытыми рамками трансляции (ОРТ).

В этой связи особый интерес представляют белки, ответственные за преодоление как специфического, так и неспецифического защитного барьера организма-хозяина. Получение таких белков в рекомбинантном виде и изучение их биологической активности приобретает первостепенное значение.

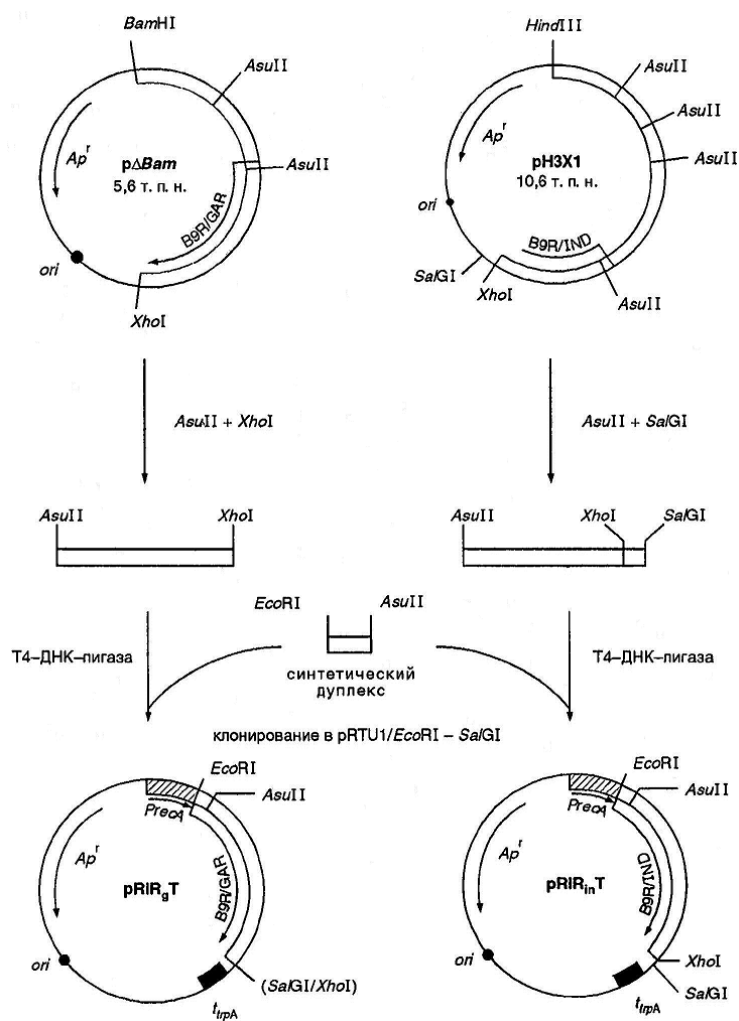
В качестве объекта изучения были выбраны два штамма вируса натуральной оспы (ВНО) – возбудителя особо опасного заболевания человека. Важно подчеркнуть, что штамм India-1967 является высоковирулентным (*Variola major*), а штамм Garcia-1966 – слабовирулентным (*Variola minor*). Ранее нашими коллегами был проведен подробный анализ генома ВНО и предсказаны гены, продукты экспрессии которых могут модулировать защитные механизмы инфицированного организма. Одним из таких белков вполне вероятно является продукт ОРТ В9R, имеющий размер 266 а/к и являющийся гомологом рецептора γ -интерферона (γ -IFN) человека.

Таким образом, цель следующего этапа работы состояла в получении белков двух штаммов ВНО, гомологичных рецептору γ -IFN человека, в клетках *E. coli* с использованием сконструированной экспрессионной векторной плазмиды pRTU1 для дальнейшего сравнительного изучения их биологической активности.

На рисунке 14 представлена общая схема конструирования целевых плазмид плазмиды pRIRgT и pRIRinT, обеспечивающих экспрессию ОРТ В9R двух штаммов ВНО. Получение целевых плазмид проводили, используя комбинацию рестриктазно-лигазного и химико-ферментативного метода, обеспечивших синтез зрелых белков в чистом виде с выходом 12-15 % от общего белка клетки (30-40 мкг/мл бактериальной культуры). Электрофореграмма клеточных лизатов приведена на рисунке 15а.

Тот факт, что целевые белки накапливаются в бактериальных клетках в составе нерастворимых телец включений позволил нам разработать несложную методику их выделения, включающую поэтапную отмывку телец включений 2 М и 4 М растворами мочевины, солюбилизацию белков в 6 М мочеvine, гель-фильтрацию и диализ (рис. 15б).

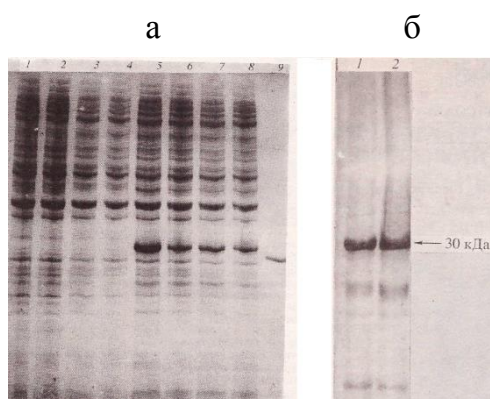
Рисунок 14 – Схема сборки плазмид pRIRgT и pRIRinT



Эксперименты по изучению специфической (интерферон-нейтрализующей) активности в отношении подавления противовирусной активности γ -IFN *in vitro* показали, что рекомбинантные вирусные белки, гомологичные рецептору γ -IFN человека, обладают высокой интерферон-нейтрализующей активностью в отношении γ -IFN человека, но не α -IFN, что подтверждает их строгую специфичность.

Полученные результаты подтверждают предположение о том, что эти белки ВНО могут играть ключевую роль в преодолении γ -IFN-составляющей иммунного барьера инфицированного организма, причем следует особо отметить, что зависимости вирулентности штаммов ВНО от удельной активности вирусных белков, гомологичных рецептору γ -IFN, не обнаружено.

Таким образом, с помощью сконструированного плазмидного экспрессионного вектора pRTU1 была успешно решена поставленная задача по получению белков ВНО, гомологичных рецептору γ -IFN человека, и изучению их биологической активности.



а: 1, 5, 7 – клетки, содержащие плазмиду pRIRgT; 2, 6, 8 – клетки, содержащие плазмиду pRIRinT; 3, 4 – клетки без плазмиды; 9 – маркерный белок 29 кДа; 1, 2 – без индукции; 3, 5, 6 – индукция митомицином С в течение 12 ч; 4, 7, 8 – индукция митомицином С в течение 6 ч; б: выделенные целевые вирусные белки из клеточной биомассы штаммов-продуцентов: 1 - *E. coli* VL1222(pRIRinT); 2 - *E. coli* VL1222(pRIRgT).

Рисунок 15 – Продукция в клетках *E. coli* VL1222 белков ВНО, гомологичных рецептору γ -IFN человека. Электрофореграмма. 15 % ПААГ

Однако следует отметить, что мы не пытались получить продукты экспрессии этих вирусных генов с использованием иных экспрессионных векторов. Поэтому было бы преждевременно делать вывод о том, что полученная экспрессионная плаزمида имеет неоспоримые преимущества перед другими. Для этого необходимо было поставить и успешно решить задачу получения в рекомбинантном виде с высоким уровнем синтеза в клетках *E. coli* какого-либо белка, получение которого с использованием других экспрессионных векторов оказалось проблематичным. Именно такая задача была поставлена и успешно решена на следующем этапе работы.

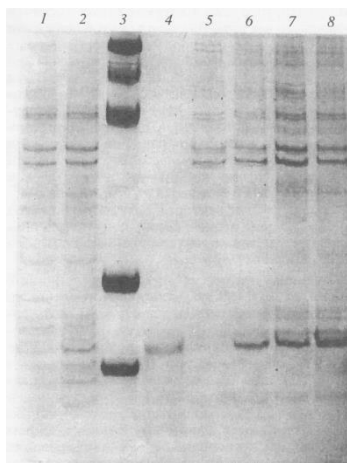
Экспрессия синтетического гена ангиогенина человека в клетках *E. coli* с использованием векторной плазмиды pRTU1. Ангиогенин представляет собой белковый фактор, индуцирующий образование и рост кровеносных сосудов, то есть он вовлечен в процесс ангиогенеза, особенно в опухолевых тканях, однако он обнаруживается и в крови здоровых людей. Связавшись с актином на поверхности эндотелиальных клеток, ангиогенин подвергается эндоцитозу, затем транслоцируется в ядро, обеспечивая эндотелиальную инвазивность, необходимую для формирования кровеносных сосудов.

Помимо теоретического интереса ангиогенин приобретает огромную практическую значимость, прежде всего в связи с возможностью создания на его основе перспективных препаратов для лечения ожогов, язв и ран различной этиологии. Понятно, что для проведения исследований в этом направлении требуются достаточные количества препарата, в то же время выделение его из природных источников весьма затруднено и малоэффективно. Таким образом, задача получения ангиогенина в рекомбинантном виде крайне актуальна.

Наши коллеги предприняли ряд попыток получить продукт экспрессии синтетического гена ангиогенина в чистом виде в различных векторных системах под контролем ИПТГ-индуцибельных промоторов *lac*-оперона *E. coli* и сильного гибридного *tac*-промотора, однако, их попытки не увенчались успехом (Чикаев Н.А., личное сообщение). Таким образом, лучшего кандидата для проверки эффективности сконструированного нами вектора экспрессии, чем ген ангиогенина человека, трудно было представить.

Для получения рекомбинантной плазмиды, экспрессирующей ген ангиогенина, последний извлекали из двуцепочечной репликативной формы бактериофага M13mp8-ang по участкам рестрикции *EcoRI* и *HindIII* и встраивали по этим же сайтам в векторную плазмиду pRTU1 с получением целевой плазмиды pRTang, содержащей синтетический ген ангиогенина человека под контролем *recA*-промотора.

В результате серии экспериментов по подбору условий культивирования лучшим штаммом для наработки рекомбинантного белка был признан штамм *E. coli* VL1222. Максимальный уровень синтеза целевого белка в этом штамме был не менее 1,5 % от суммарного клеточного белка (или 30 % суммарного белка грубого клеточного дебриса, представляющего собой нерастворимую фракцию клеточных белков, содержащую тельца включений с ангиогенином) и достигал 10 мкг/мл бактериальной культуры, что вполне достаточно не только для лабораторного, но и для промышленного производства.



На рисунке 16 приведены результаты одного из экспериментов по индукции синтеза рекомбинантного ангиогенина человека и показано содержание целевого продукта в нерастворимой фракции клеток-продуцентов.

- 1 – лизат клеток без индукции промотора;
- 2 – лизат клеток после 6 ч индукции митомидином С;
- 3 – набор маркеров молекулярных масс: 132; 94; 66; 20,1; 13,7 кДа;
- 4 – ангиогенин («Ферментас», Вильнюс, Литва);
- 5 – нерастворимая белковая фракция – без индукции;
- 6 – то же после 2 ч индукции митомидином С;
- 7 – то же после 6 ч индукции;
- 8 – то же после 12 ч индукции.

Рисунок 16 – Экспрессия синтетического гена ангиогенина человека в клетках штамма-продуцента *E. coli* VL1222(pRTang). Электрофореграмма. 15 % ПААГ

Иммуноспецифичность синтезируемого рекомбинантного белка была показана методом иммуноблоттинга с использованием моноклональных антител к ангиогенину человека.

Таким образом, удалось добиться эффективной прямой экспрессии гена ангиогенина человека в клетках *E. coli* благодаря использованию нового плазмидного вектора pRTU1. Тот факт, что в других системах экспрессии результата достичь не удалось, а экспрессионный вектор pRTU1 обеспечил достаточно высокий уровень синтеза рекомбинантного ангиогенина человека, позволяет сделать вывод о его перспективности и надежности.

Тем самым была завершена серия экспериментов по созданию экспрессионной векторной плазмиды, обеспечивающей клонирование и эффективную экспрессию чужеродных генов в клетках *E. coli*. Нам удалось продемонстрировать эффективную экспрессию генов различного происхождения: как природных, так и искусственных, как нативных, так и мутантных, как индивидуальных, так и химерных, как бактериальных, так и вирусных, а также человеческих.

Конструирование рекомбинантной плазмиды pcDNA-TCI, содержащей искусственный ген TCI, кодирующий множественные CTL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1, как кандидатной ДНК-вакцины. Успех создания эффективной вакцины против ВИЧ многие исследователи в последнее время связывают с получением искусственных ДНК-вакцинных конструкций, индуцирующих CTL-ответы на множественные специфические эпитопы вирусных белков. В ГНЦ ВБ «Вектор» под руководством С.И. Бажана был проведен дизайн искусственного Т-клеточного иммуногена TCI (T Cell Immunogen), кандидата для использования в качестве ДНК-вакцины против ВИЧ-1.

К началу наших работ в этом направлении уже было идентифицировано достаточно много эпитопов, вовлеченных в индукцию ВИЧ-1-специфичных CTL-ответов у инфицированных людей. База данных *Los Alamos HIV Molecular Immunology Database* содержала около 800 эпитопов, рестриктированных аллелями класса HLA-I. Для конструирования иммуногена TCI, кандидата в ДНК-вакцину, были выбраны те из них, которые удовлетворяют следующим критериям: индуцируют как CD8+ CTL, так и CD4+ Т-хелперы и являются высоко

консервативными среди подтипов А, В и С ВИЧ-1, обнаруживаемых на территории России, США и многих европейских стран; входят в состав основных вирусных белков, индуцирующих CTL-ответы (Env, Gag, Pol и Nef); в совокупности рестриктированы десятью различными оптимально подобранными аллелями класса HLA-I; не имеют гомологии с белками человека.

Таким образом, была получена виртуальная полипептидная цепь, состоящая из всех отобранных эпитопов, объединенных в порядке их картирования в геноме ВИЧ-1. Длина белка-иммуногена TCI составляет 392 а/к. Он содержит более восьмидесяти эпитопов (как CD8+ CTL, так и CD4+ Т-хелперы), многие из которых перекрываются. Следует особо отметить, что для того, чтобы иметь возможность исследовать CTL-ответы, индуцируемые ДНК-вакциной на модели экспериментальных животных, в состав целевого иммуногена были также включены эпитопы, представляемые молекулами MHC-I класса мышей и обезьян *Macaca rhesus* (*Macaca mulatta*).

Отметим, что последовательность гена, кодирующая белок TCI (392 а/к), является достаточно протяженной и составляет 1176 п.н., поэтому химический синтез гена TCI является достаточно трудоемкой задачей. Мы приняли решение использовать альтернативный и более экономичный подход к синтезу гена TCI, который основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для амплификации фрагментов генома ВИЧ, кодирующих непрерывные районы белка TCI, в качестве матрицы в ПЦР мы использовали геномную кДНК, ввиду того, что последовательности а/к интересующих нас районов полностью идентичны таковым в белке TCI.

Поскольку TCI-иммуноген состоит как из достаточно протяженных, так и коротких фрагментов, которые в белках ВИЧ-1 пространственно разнесены, то предложенная технология сборки целевого гена, основанная на ПЦР, состояла в использовании набора «гибридных» праймеров, позволяющих объединить эти разобщенные фрагменты генома ВИЧ-1 в одну непрерывную последовательность. В процессе синтеза трех блоков гена (блок 1 содержит фрагменты, кодирующие CTL-эпитопы гена *gag*; блок 2 – кодирует CTL-эпитопы гена *env*; Блок 3 – генов *pol* и *nef*), на которые он был разбит в соответствии с разработанной нами схемой сборки полного гена, мы использовали комбинацию матричного и безматричного синтеза методом ПЦР (имеется в виду наличие или отсутствие в реакционной смеси кДНК ВИЧ-1 в качестве матрицы). Во втором случае короткие фрагменты целевого гена, кодирующие отдельные эпитопы, были включены в состав частично перекрывающихся праймеров для амплификации.

Разработанные схемы синтеза целевых блоков гена искусственного иммуногена TCI представлены на рисунке 17. Этапы ПЦР (отмечены вертикальными стрелками) пронумерованы римскими цифрами. Праймеры (горизонтальные стрелки) пронумерованы арабскими цифрами. Чередующиеся черные и серые прямоугольники внутри блоков гена TCI соответствуют последовательностям генома ВИЧ-1, кодирующим непрерывные районы белка TCI. В олигонуклеотиды 1, 7, 15 заложены сайты узнавания для рестриктаз *Bam*HI, а в праймеры 5 и 22 – *Sal*I (в случае блока 1 – праймер 10 – *Xho*I) для клонирования в векторе pFN123, обозначенные внизу каждого рисунка, а в олигонуклеотиды 2, 3, 5 введены “молчащие” мутации, приводящие к исчезновению сайта узнавания для рестриктазы *Fok*I. Кроме того, в праймер 7 введен иницирующий кодон трансляции ATG, а в олигонуклеотид 5 – стоп-кодон трансляции TGA.

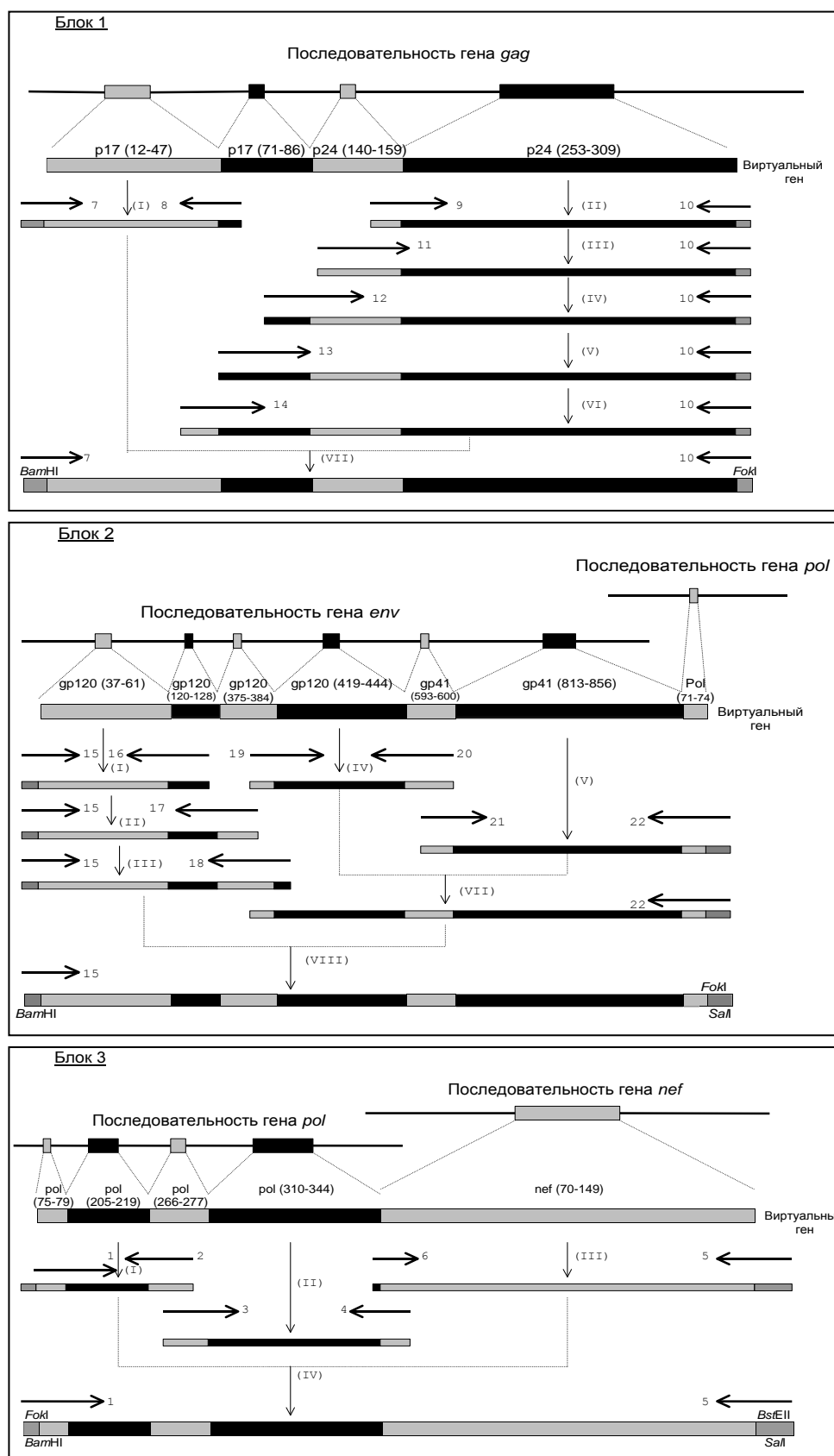


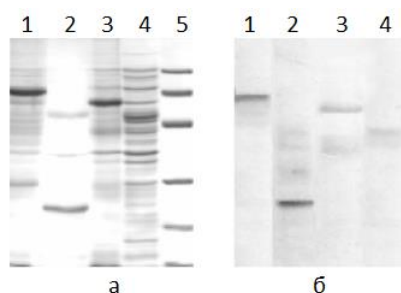
Рисунок 17 – Схема сборки трех блоков гена TCI

Все три фрагмента были клонированы в составе вышеназванного плазмидного вектора по участкам рестрикции *Bam*HI и *Sal*I. Использование плазмиды pFH123 для клонирования фрагментов гена целевого иммуногена обеспечило нам простую инвариантную сборку полноразмерного гена TCI. С этой целью блоки гена TCI

были выделены из несущих их рекомбинантных плазмид (блок 1 – *Bam*HI-*Fok*I-фрагмент, блок 2 – *Fok*I-*Fok*I-фрагмент и блок 3 представлял собой *Fok*I-*Sal*I-фрагмент) и одновременно клонированы вновь в векторной плазмиде рFH123 по участкам рестрикции *Bam*HI и *Sal*I, в результате чего была получена целевая рекомбинантная плазмида рFH-TCI. Каковы же преимущества разработанной блочной схемы получения искусственного гена TCI? Отметим основные из них:

- разработанная схема предполагает инвариантность сборки всех фрагментов ДНК, что существенно облегчает скрининг рекомбинантных клонов и отбор целевых плазмид;
- независимый синтез и клонирование трех разных фрагментов (блоков) гена TCI фактически обеспечивает получение трех разных СТЛ-иммуногенов, иммунобиологические свойства (протективность, иммуногенность) которых могут быть исследованы как индивидуально, так и в различных смешанных комбинациях;
- наличие отдельных блоков позволяет достаточно быстро синтезировать любой набор новых генов (в том числе и целевой ген TCI), причем каждый из блоков может быть легко модифицирован или заменен другим;
- в 3'-концевой части гена TCI организованы участки рестрикции (*Psp*EI (*Bst*EP) перед терминирующим кодоном трансляции и *Sal*I сразу после него), позволяющие получать новые генетические конструкции путем добавления последовательностей, кодирующих другие эпитопы или иные иммуномодуляторы, с целью повышения эффективности вакцинных препаратов, создаваемых на основе рекомбинантных молекул ДНК.

Для доказательства наличия эпитопов ВИЧ-1 в составе рекомбинантного белка, кодируемого геном TCI, последний был экспрессирован в клетках *E. coli* в виде химерных белков с тиоредоксином (TRN) и глутатион-S-трансферазой (GST) *Schistosoma japonicum*. С этой целью были сконструированы рекомбинантные плазмиды рЕТ-TCI и рGEX-TCI, которые получали клонированием гена TCI (в виде *Bam*HI-*Sal*I-фрагмента плазмиды рFH-TCI) в векторных плаزمиде рЕТ32а и рGEX-4T-1 соответственно. ВИЧ-1-антигенные свойства искусственного иммуногена TCI в составе химерных белков TRN-TCI и GST-TCI были продемонстрированы в ИФА с использованием панели ВИЧ-1 позитивных сывороток и методом иммуноблоттинга с МКА 29F2 и 30A6, которые связываются с эпитопом EPFRDYVDRFYKTL, локализованном как в белке р24 ВИЧ-1, так и в белке TCI (рис. 18). Кроме того, была показана и специфическая иммуногенность рекомбинантного белка TRN-TCI: сыворотка кролика, иммунизированного этим белком, реагировала не только с обоими рекомбинантными белками TRN-TCI и GST-TCI, но и с природным белком р24 ВИЧ-1.

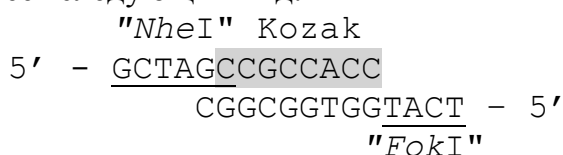


1 – лизат индуцированных клеток *E. coli* XL1-blue(pGEX-TCI); 2 – очищенный белок р24 ВИЧ-1; 3 – лизат индуцированных клеток *E. coli* XL1-blue(pET-TCI); 4 – лизат клеток *E. coli* XL1-blue без плазмиды; 5 – маркерные белки: 97,4 кДа, 66,2 кДа, 45,0 кДа, 31,0 кДа, 21,5 кДа, 14,0 кДа.

Рисунок 18 – Анализ химерных белков, содержащих TCI. 13 % ПААГ, электрофореграмма (а). Иммуноблот с использованием МКА к белкам р24 ВИЧ-1 и TCI (б)

Совершенно необходимым условием создания ДНК-вакцины является способность целевого гена экспрессироваться в эукариотической системе. Анализ литературных данных показал, что самыми многообещающими векторами в этом плане являются векторы, направляющие экспрессию целевых генов под контролем промотора из длинных концевых повторов вируса саркомы Рауса (RSV LTR) либо предраннего промотора цитомегаловируса (CMV). Поэтому мы приняли решение получить обе плазмидные конструкции, содержащие под контролем вышеуказанных промоторов синтезированный ген TCI.

Итак, последовательность гена TCI была клонирована в эукариотическом фагмидном векторе pBK-RSV (Stratagen, США), который позволяет экспрессировать ген TCI в эукариотических клетках. Для того чтобы экспрессия целевого гена TCI была наиболее оптимальной, перед стартовым ATG-кодоном была введена консенсусная последовательность Kozak, точнее, ее часть, предшествующая иницирующему кодону, для оптимизации трансляции мРНК TCI. С этой целью векторную плазмиду обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NheI* и *SalI* и выделяли векторную часть, синтетический ген TCI получали в виде *FokI-SalI*-фрагмента из ранее сконструированной плазмиды pFH-TCI и лигировали их совместно с коннектором, составленным из двух олигонуклеотидов. Коннектор содержит Kozak-последовательность и «липкие» концы, комплементарные таковым вектора и гена, полученным в результате действия рестриктаз *NheI* и *FokI*. Структура коннектора имеет следующий вид:



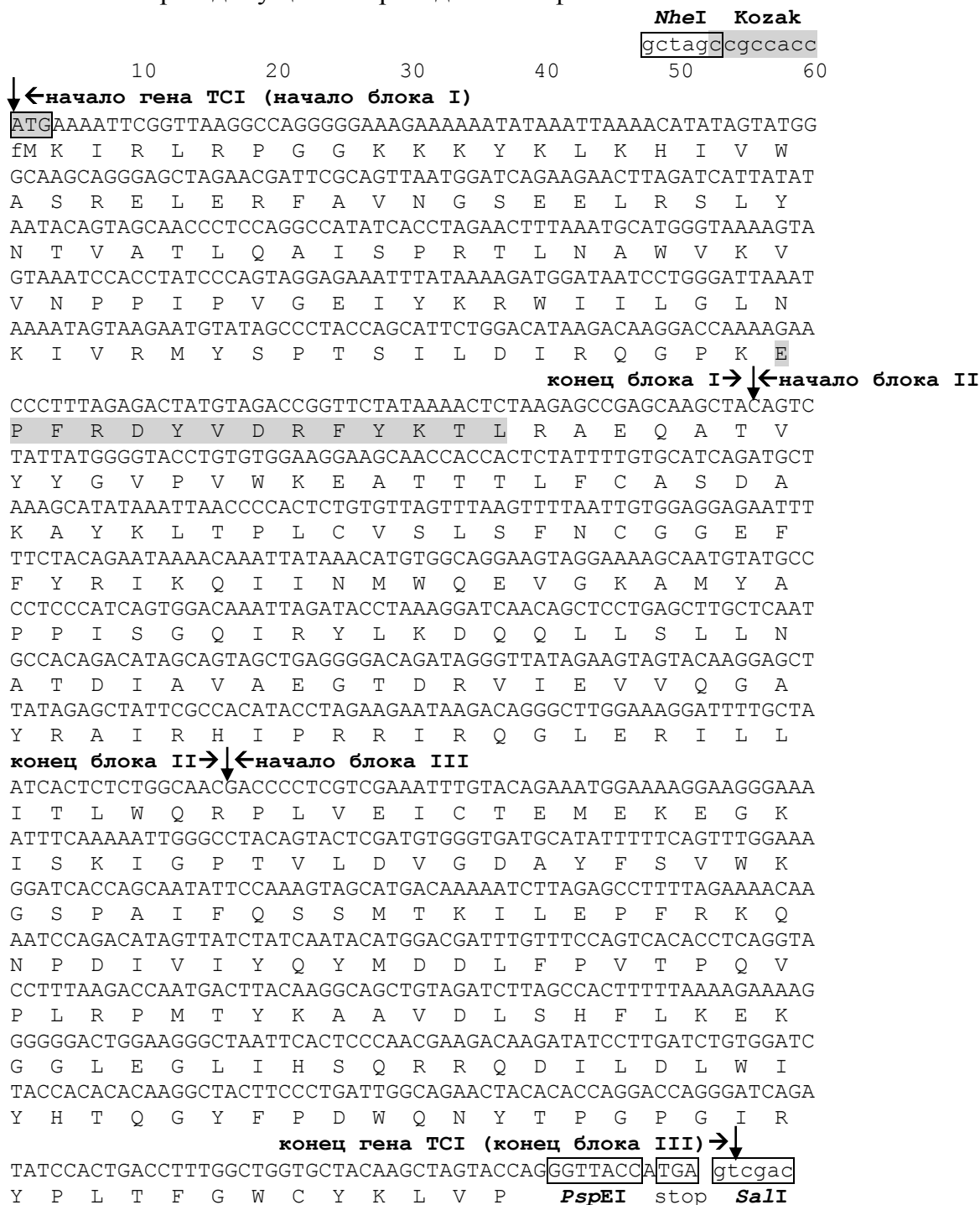
В результате скрининга бактериальных клонов была получена целевая рекомбинантная плаزمиды pBK-RSV-TCI. На рисунке 19 приведена полная нуклеотидная последовательность гена TCI с фланкирующими районами в составе этой плазмиды, а также а/к последовательность кодируемого этим геном белка. Отмечены границы блоков, на которые предварительно был разбит ген согласно разработанной схеме синтеза, выделены значимые участки рестрикции и другие структурные элементы.

Получение второй плазмидной конструкции pcDNA-TCI осуществляли параллельно с вышеописанным экспериментом по той же схеме.

Следует подчеркнуть, что при таком способе клонирования нами был удален протяженный плазмидный фрагмент, содержащий ген *lacZ* *E. coli*, присутствие которого в целевой плазмиде лишено смысла. С этой целью мы предварительно в плазмиде pcDNA3.1/*myc*-His(-)/*lacZ* инвертировали *ApaI*-фрагмент, содержащий ген *lacZ* с прилегающими уникальными участками рестрикции. В результате получили сайты *NheI*, *ApaI*, *HindIII*, *BamHI* перед инвертированным геном *lacZ* и *NotI*, *XhoI*, *XbaI*, *ApaI* вслед за ним, что обеспечивает больший выбор вариантов клонирования целевых генов, причем независимо от удаления гена *lacZ* его экспрессия будет невозможной в эукариотических клетках. В этом эксперименте векторная часть инвертированной плазмиды pcDNA3.1/*myc*-His(-)/*lacZ* представляла собой *NheI-XhoI*-фрагмент, тогда как и ген TCI, и коннектор были теми же. Таким образом, мы одновременно получили и вторую целевую плазмиду pcDNA-TCI (рис. 20), которая в дальнейших экспериментах продемонстрировала

больший вакцинный потенциал, чем рВК-RSV-TCI, и стала основой для создания новых вакцинных препаратов против ВИЧ/СПИД.

Результаты наших совместных с коллегами работ в этом направлении защищены тремя патентами РФ. Вакцина “КомбиВИЧвак”, содержащая рекомбинантную плазмиду рсDNA-TCI в качестве ДНК-вакцинного компонента, успешно прошла доклинические испытания, продемонстрировав неплохой вакцинный потенциал, затем I фазу клинических испытаний на добровольцах, по результатам которой допущена к проведению II фазы клинических испытаний.



EPFRDYVDRFYKTL – эпитоп белка р24 ВИЧ-1, связывающийся с МКА 29F2 и 30A6.

Рисунок 19 – Нуклеотидная и кодируемая а/к последовательности гена (белка) TCI в плаزمиде рВК-RSV-TCI и рсDNA-TCI с фланкирующими районами. Пояснения в тексте

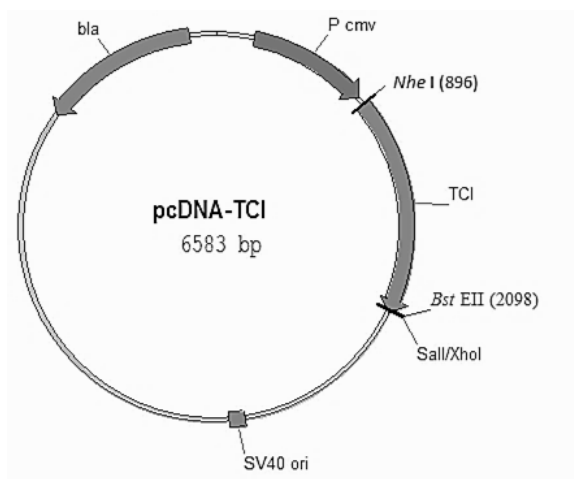


Рисунок 20 – Структура рекомбинантной плазмиды pcDNA-TCI

Создание генетических конструкций с оптимизированной структурой генов полиэпитопных иммуногенов для высокоэффективной индукции CTL-ответов. Необходимо отметить, что хотя при конструировании иммуногена TCI использовались

оптимально подобранные эпитопы, его структура не оптимизировалась. Поэтому следующая задача нашей работы состояла в разработке рациональных стратегий конструирования рекомбинантных ДНК, кодирующих полиэпитопные иммуногены, структура которых оптимизирована для индукции высоких уровней ответов CD8⁺ CTL с целью создания новых кандидатных эффективных и безопасных вакцин против ВИЧ-1.

Известно, что CD8⁺ CTL распознают вирусные белки-антигены, синтезируемые внутри клетки, не в виде полноразмерных белков, а в виде коротких пептидов длиной 9-12 а/к, ассоциированных с молекулами МНС-I класса. Эти короткие пептиды представляют собой антигенные эпитопы, появляющиеся из эндогенно синтезируемых вирусных белков в результате протеасом-опосредуемого процессинга. Затем они переносятся в просвет эндоплазматического ретикулума (ER) при помощи транспортных белков TAP (transporter associated with antigen processing), где связываются с вновь синтезированными молекулами МНС-I класса.

Для обеспечения высоких значений CD8⁺ CTL-ответов необходимо соблюдение некоторых условий, таких как: высокий уровень экспрессии целевых генов, эффективный протеасом-опосредуемый процессинг кодируемых ими белков-иммуногенов, транспорт образовавшихся пептидных эпитопов в ER, эффективное представление антиген-презентирующими клетками (АПК) комплексов [эпитоп/МНС-I], образованных пептидами с молекулами МНС-I класса.

Для решения этой многофакторной задачи, во-первых, были отобраны эпитопы, обладающие высоким значением времени полужизни комплексов [эпитоп/МНС-I], во-вторых, при трансляции а/к последовательности в нуклеотидную были использованы кодоны высокоэкспрессируемых генов человека, в-третьих, для нацеливания полиэпитопного иммуногена на протеасому мы решили использовать слияние с целевым геном последовательности, кодирующей убиквитин (Ub), причем, в двух вариантах: как с 3'-конца гена полиэпитопной конструкции, так и с 5'-конца этого гена, в-четвертых, в составе полиэпитопной конструкции CTL-эпитопы были фланкированы спейсерными последовательностями, содержащими сайты протеасомного расщепления и мотивы узнавания для TAP с целью эффективного транспорта освободившихся эпитопов в ER для связывания с молекулами МНС-I класса.

Таким образом, для надлежащей проверки вклада тех или иных факторов в иммуногенный потенциал генетических конструкций нам было необходимо

получить девять различных рекомбинантных плазмид в качестве кандидатных ДНК-вакцин. Какие иммуногены должны кодировать эти плазмиды?

C1 (конструкция 1) – простое объединение эпитопов в "бусоподобную" структуру, когда CTL-эпитопы просто соединяются вместе без фланкирующих остатков;

C2 – разделение соседних эпитопов специфическими а/к, предназначенными для оптимизации протеасомного освобождения детерминант;

C3 – разделение соседних эпитопов а/к, формирующими мотивы распознавания для ТАР наряду с мотивами протеасомного процессинга.

Каждая из этих конструкций может быть генетически слита с геном Ub как с 3'-конца гена полиэпитопной конструкции, так и с его 5'-конца:

C1-Ub, C2-Ub, C3-Ub и Ub-C1, Ub-C2, Ub-C3.

Итак, совершенно очевидно, что простой синтез такого количества достаточно протяженных генетических конструкций является весьма трудоемкой, дорогостоящей и длительной процедурой. Мы приняли решение оптимизировать процесс получения целевых конструкций и разработать относительно простую и удобную схему решения поставленной задачи.

На первом этапе нам следовало определиться с эукариотическим экспрессионным вектором, на основе которого надлежало получить целевые полиэпитопные генетические конструкции. Результаты, полученные нами ранее и описанные выше, по изучению вакцинного потенциала различных рекомбинантных плазмид, направляющих в эукариотических клетках синтез иммуногена TCI, утвердили нас в мысли использовать для этого в качестве основы проверенную и хорошо себя зарекомендовавшую плазмиду pcDNA3.1/*myc*-His(-)/*lacZ*.

Основная идея схемы конструирования рекомбинантных плазмид состояла в универсальности клонирования всех целевых генов, причем синтезировать было необходимо лишь три генетические конструкции: C1, C2 и C3. Однако параллельно на базе вышеназванной плазмиды требовалось сконструировать три новые векторные плазмиды для клонирования этих искусственных генов. Универсальность в известной мере заключалась в использовании одних и тех же сайтов клонирования во всех генетических вариантах. Такая схема позволяла клонировать полученные искусственные гены в составе одного из векторов и, убедившись по результатам секвенирования в соответствии нуклеотидной последовательности генетических конструкций заданной, просто реклонировать соответствующие фрагменты ДНК в двух других векторах с получением целевого набора из девяти рекомбинантных плазмид, направляющих синтез полиэпитопных CTL-иммуногенов.

Таким образом, принимая во внимание нуклеотидные последовательности всех искусственных генов и исходной векторной плазмиды, составив их полные рестриктные карты, мы определились с участками узнавания для эндонуклеаз рестрикции, которые намеревались использовать для клонирования синтетических фрагментов ДНК как при конструировании серии векторных плазмид, так и целевых рекомбинантных плазмид, экспрессирующих гены полиэпитопных CTL-иммуногенов. При выборе участков узнавания для рестриктаз кроме низкой частоты встречаемости в различных геномах мы руководствовались также надежностью гидролиза в случае, когда сайт находится на концах молекулы ДНК, и коммерческой доступностью фермента. Общие для всех генов вспомогательные элементы мы также решили включить в состав серии векторов.

Итак, на рисунке 21 подробно приведены нуклеотидные и кодируемые ими а/к последовательности встроенных в векторную плазмиду синтетических фрагментов по участкам рестрикции *HindIII-XhoI*. При этом были удалены протяженные фрагменты генома *E. coli*, как подробно описано выше в случае конструирования рекомбинантной плазмиды pcDNA-TCI. Таким образом, векторная часть всех описанных здесь плазмид практически идентична таковой плазмиды pcDNA-TCI, что позволяет нам надеяться на хороший уровень экспрессии целевых генов, как это имеет место быть в случае экспрессии искусственного гена TCI в составе вышеназванной плазмиды, обладающей хорошим вакцинным потенциалом.

Стратегия кодирования во всех векторных плазмидах этой серии сходна: экспрессия генов направляется CMV-промотором, эффективная трансляция целевых информационных РНК обеспечивается сформированной нами консенсусной последовательностью Kozak, все они содержат последовательности, кодирующие НА- и Gag-эпитопы (на 5'- и 3'-конце генов полиэпитопных иммуногенов соответственно), для мониторинга экспрессии и метаболической стабильности целевых иммуногенов. Кроме того, плазмиды pV2 и pV3 содержат также Ub-кодирующую последовательность для генетически присоединяемого убиквитина к N- и С-концу целевых полиэпитопных конструкций соответственно. Все рекомбинантные плазмиды содержат терминирующий кодон трансляции, обеспечивающий синтез строго заданной полипептидной цепи без каких-либо дополнительных а/к. Все гены полиэпитопных иммуногенов клонируются в любом векторе (pV1, pV2, pV3) по *KpnI-PspEI*-участкам рестрикции.

Таким образом, нами разработана оптимальная схема получения большого набора рекомбинантных плазмид, обеспечивающих синтез различных вариантов как полиэпитопных иммуногенов – кандидатов в ДНК-вакцины против ВИЧ-1, так и любых других иммуногенов с целью оценки различных аспектов их вакцинного потенциала.

На первом этапе конструировали векторную плазмиду pV2 путем клонирования синтетического ПЦР-фрагмента ДНК, который получали методом поэтапной достройки пяти пар перекрывающихся олигонуклеотидных праймеров в следующей последовательности (рис. 22).

Целевой ПЦР-фрагмент подвергали действию рестриктаз *HindIII* и *XhoI* и клонировали в составе вышеназванной плазмиды с инвертированным *ApaI*-фрагментом по участкам рестрикции *HindIII-XhoI*. Полученная векторная плаزمида pV2 в дальнейшем служила матрицей в ПЦР для конструирования других целевых плазмид этой серии – pV1 и pV3.

Для получения плазмиды pV1 на матрице плазмиды pV2 с помощью праймеров (V1-1F)+(V2-10R) методом ПЦР синтезировали целевой фрагмент ДНК, который затем клонировали аналогично вышеописанному (рис. 23).

Плазмиду pV3 получали, используя уже сконструированные плазмиды pV1 и pV2. Используя плазмиду pV2 в качестве матрицы и праймеры (V3-2F)+(V3-3R), методом ПЦР синтезировали и выделили фрагмент ДНК длиной 279 п.н., кодирующий последовательность Ub и часть Gag-эпитопа (рис. 24). Затем этот фрагмент служил матрицей следующего этапа ПЦР с праймерами (V3-1F)+(V3-3R), вследствие чего он был удлинен с 5'-конца с получением целевого фрагмента, который гидролизировали рестриктазами *PspEI* и *XhoI* и клонировали в векторе pV1 по этим же участкам рестрикции. В результате была получена плазма pV3.

30

Стратегия кодирования и клонирования

Нуклеотидная и а/к последовательности

GGCGCCACC ATG – консенсусный Kozak-мотив;

YPYDVPDYA – HA-эпитоп;

EPFRDYVDRFYKTL – Gag-эпитоп (МКА 29F2/30AG(p24,Gag))

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLGV - Ub-V₇₆

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLGG - Ub-G₇₆

Рисунок 21 (окончание) – Структура *Hind*III-*Xho*I-фрагмента векторных плазмид pV1, pV2 и pV3, предназначенных для клонирования целевых генов по сайтам рестрикции *Kpn*I и *Psp*EI

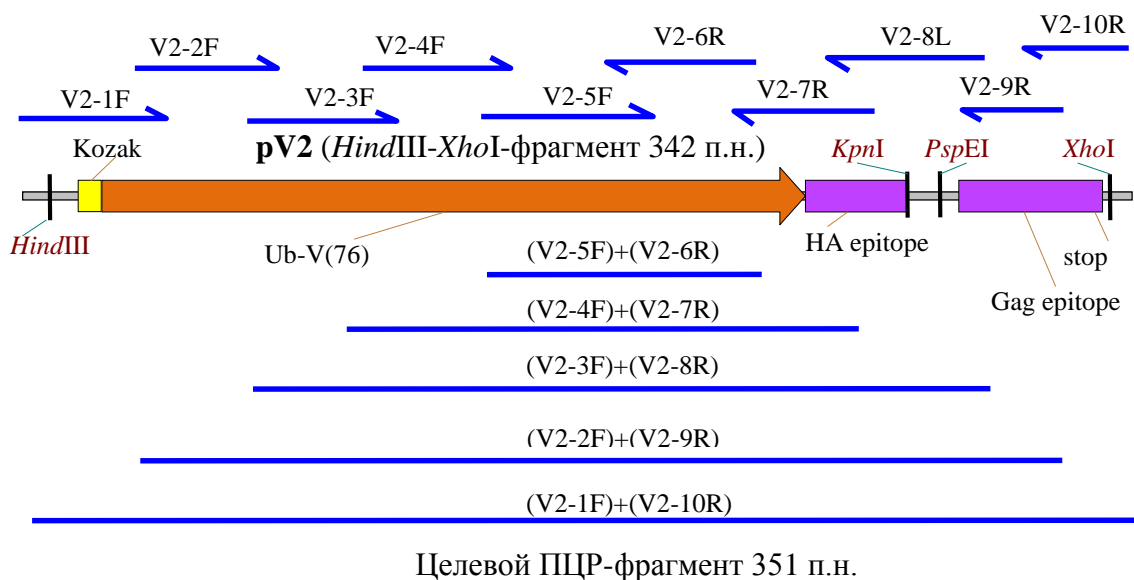


Рисунок 22 – Схема синтеза *HindIII-XhoI*-фрагмента векторной плазмиды pV2. Над физической и рестриктной картой фрагмента показано расположение пяти пар перекрывающихся праймеров. Под картой схематично изображено поэтапное удлинение ПЦР-фрагмента

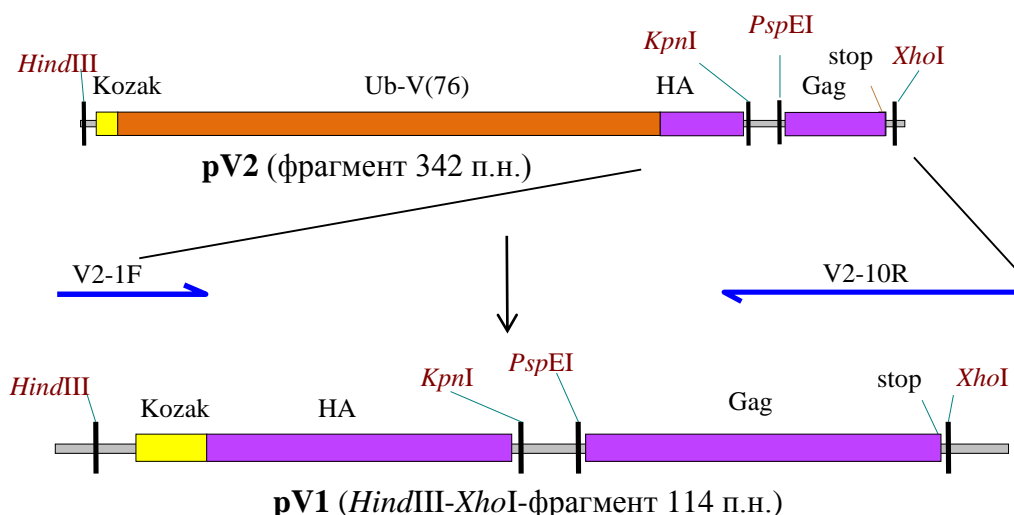


Рисунок 23 – Физическая и рестриктная карта, схема синтеза методом ПЦР *HindIII-XhoI*-фрагмента векторной плазмиды pV1 на матрице плазмиды pV2

Таким образом, благодаря оптимизации схемы получения набора векторных плазмид, после конструирования плазмиды pV2 с помощью 10 рассчитанных перекрывающихся праймеров для получения на ее основе плазмиды pV1 нам понадобился всего один дополнительный праймер, для создания плазмиды pV3 – три праймера.

После разработки детальной схемы конструирования целевых рекомбинантных плазмид мы определились не только с дизайном полипептидных цепей иммуногенов, но и утвердили окончательную структуру кодирующих их генов. Результаты этого этапа работы приведены на рисунке 25. Необходимые пояснения к рисунку: выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в генах участки узнавания для эндонуклеаз рестрикции *KpnI* и *PspEI*, по которым проводится

встройка генов в экспрессионные векторные плазмиды pV1, pV2, pV3; последовательности, кодирующие HA- и Gag-эпитопы, выделенные большими блоками с черной заливкой, включены в состав вышеназванных векторных плазмид; эпитоп SIINFEKL (выделен большим блоком с серой заливкой) включен как С-концевой эпитоп для мониторинга экспрессии и иммуногенности вакцинных конструкций с помощью антител 25-D1.16, специфичных к комплексам [Kb-SIINFEKL].

Кроме набора отобранных CTL-детерминант все полиэпитопные иммуногены содержат так называемый универсальный пептид 'PADRE' (AKFVAAWTLKAAA), предназначенный для усиления CD8+ CTL-ответов благодаря способности вызывать ответы CD4+ Т-клеток в ассоциации с множественными HLA-DR аллморфами, и с молекулами I-Ab, экспрессируемыми трансгенными мышами.

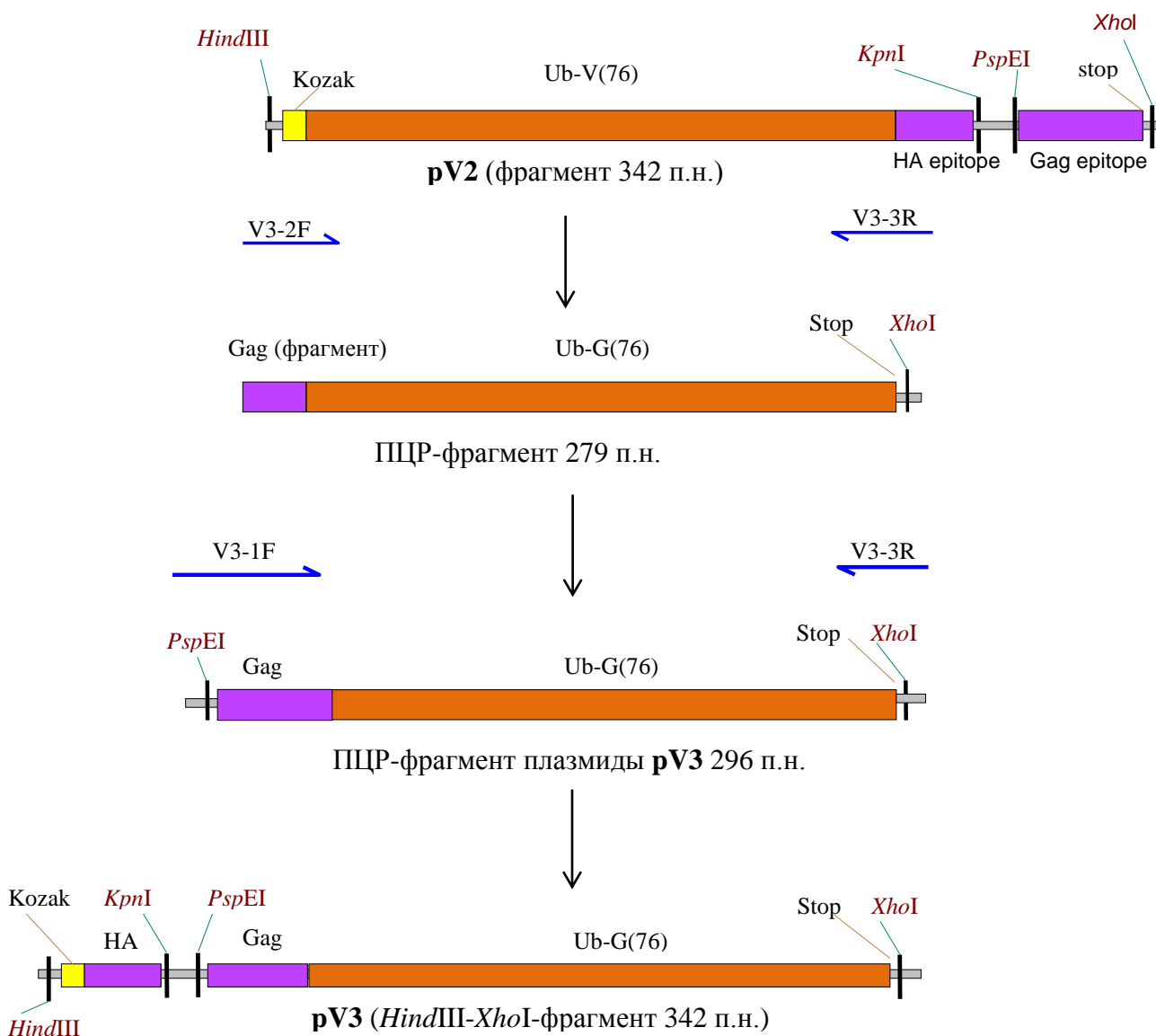


Рисунок 24 – Физическая и рестриктная карта *Hind*III-*Xho*I-фрагмента векторной плазмиды pV3 (внизу) и схема поэтапного синтеза методом ПЦР *Psp*EI-*Xho*I-фрагмента векторной плазмиды pV3 на матрице плазмиды pV2

Полиэпитопная конструкция C1 – простое объединение пептидов в "бусоподобную" структуру

YPYDVDPDYAWYLAKFVAAWTLKAAASLYNTVATLALVEICTEMVIYQYMDLILKEPVHGVQMHEDIISLKLTPLCVTLRLRDLILLIVVLEWRFDSRLRILQQLLFIVLAEAMSQV
RGPGRAFVTISIINFEKLQVTEPFRDYVDRFYKTL

Структура гена C1

KpnI
TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC**GGTACC**TGGCCAAGTTCGTGGCCGCCTGGACCCTGAAGGCCGCCGCCTCCCTGTACAACACCGTGCCACCCTGGCCCTGGTGGAGAT
CTGCACCGAGATGGTGATCTACCAGTACATGGACGACCTGATCCTGAAGGAGCCCGTGACGGCGTGACAGATGCACGAGGACATCATCTCCCTGAAGCTGACCCCCCTGTGCGTGA
CCCTGCGCCTGCGCGACCTGCTGCTGATCGTGGTGCTGGAGTGGCGCTTCGACTCCCGCCTGCGCATCCTGCAGCAGCTGCTGTTCATCGTGCTGGCCGAGGCCATGTCCAGGTG
CGCGGCCCCGCCGCGCCTTCGTGACCATCTCCATCATCAACTTCGAGAAGCTGCAG**GGTGACC**GAGCCCTTCCGCGACTACGTGGACCCTTCTACAAGACCCTG
PspEI

Полиэпитопная конструкция C2 – Разделение соседних пептидов а/к для оптимизации протеасомного освобождения детерминант

YPYDVDPDYAWYLKFLAKFVAAWTLKAAAADSLYNTVATLALVEICTEMADVIYQYMDLA~~ILKEPVHGV~~ADQMHEDIISLKLTPLCVTLRLRDLILLIVADVLEWRFDSRLRILQQ
LLFI~~AVLAEAMSQV~~ADRGPGRAFVTISIINFEKLQVTEPFRDYVDRFYKTL

Структура гена C2

KpnI
TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC**GGTACC**TGAAGTTCCTGGCCAAGTTCGTGGCCGCCTGGACCCTGAAGGCCGCCGCCGCGACTCCCTGTACAACACCGTGCCACCCT
GGCCCTGGTGGAGATCTGCACCGAGATGGCCGACGTGATCTACCAGTACATGGACGACCTGGCCATCCTGAAGGAGCCCGTGACGGCGTGCCGACCATGACGAGGACATCA
TCTCCCTGAAGCTGACCCCCCTGTGCGTGACCCCTGCGCCTGCGCGACCTGCTGCTGATCGTGGCCGACGTGCTGGAGTGGCGCTTCGACTCCCGCCTGCGCATCCTGCAGCAGCTG
CTGTTCATCGCCGTGCTGGCCGAGGCCATGTCCAGGTGGCCGACCGCGGCCCGGCCGCGCCTTCGTGACCATCTCCATCATCAACTTCGAGAAGCTGCAG**GGTGACC**GAGCCCTT
CCGCGACTACGTGGACCCTTCTACAAGACCCTG
PspEI

Полиэпитопная конструкция C3 – Разделение соседних пептидов а/к, обеспечивающими мотивы распознавания для TAP

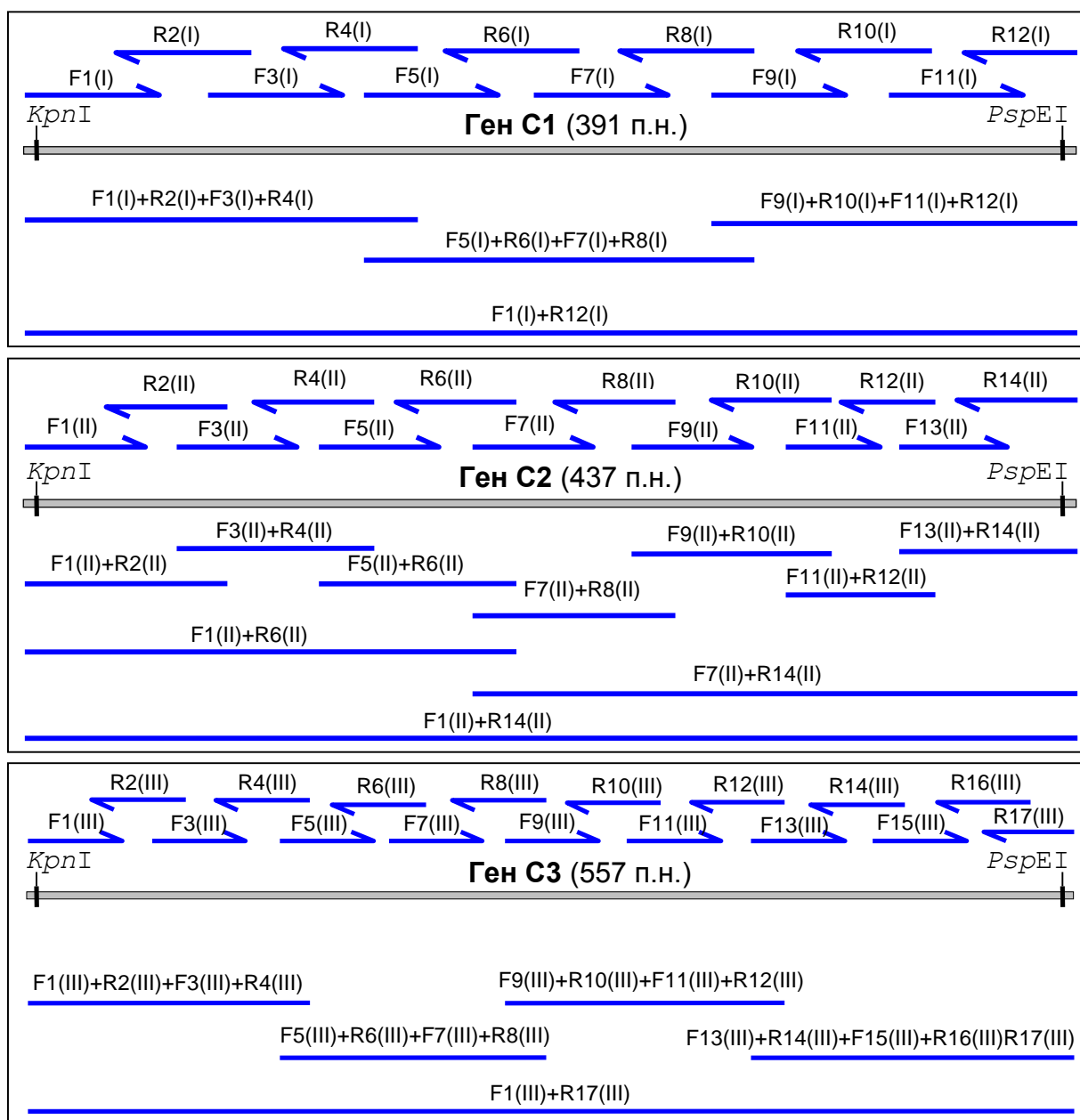
YPYDVDPDYAWYLKFLRQYAKFVAAWTLKAAANIW~~SLYNTVATLRIW~~ALVEICTEMADRIWVIYQYMDLADKQW~~ILKEPVHGV~~ADRWQMHEDIISLNIW~~KLTPLCVTLRIW~~RL
RDLILLIVADRIWVLEWRFDSRLADNQYRILQQLFI~~AKRW~~VLAEMSQVADNIW~~RGPGRAFVTI~~NIYSIINFEKLQVTEPFRDYVDRFYKTL

Структура гена C3

KpnI
TACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCC**GGTACC**TGAAGTTCCTGCGCCAGTACGCCAAGTTCGTGGCCGCCTGGACCCTGAAGGCCGCCGCCAACATCTGGTCCCTGTACAACAC
CGTGCCACCCTGCGCATCTGGGCCCTGGTGGAGATCTGCACCGAGATGGCCGACCGCATCTGGGTGATCTACCAGTACATGGACGACCTGGCCGACAAGCAGTGATCCTGAAGG
AGCCCGTGACGGCGTGCCGACCGCAGTGGCAGATGCACGAGGACATCATCTCCCTGAACATCTGGAAGCTGACCCCCCTGTGCGTGACCCCTGCGCATCTGGCGCCTGCGCGAC
CTGCTGCTGATCGTGGCCGACCGCATCTGGGTGCTGGAGTGGCGCTTCGACTCCCGCCTGGCCGACAACCAGTACCGCATCCTGCAGCAGCTGCTGTTCATCGCCAAGCGCTGGGT
GCTGGCCGAGGCCATGTCCAGGTGGCCGACAACATCTGGCGCGGCCCGGCCGCGCCTTCGTGACCATCAACATCTACTCCATCATCAACTTCGAGAAGCTGCAG**GGTGACC**GAGC
CCTTCCGCGACTACGTGGACCCTTCTACAAGACCCTG
PspEI

Рисунок 25 – Дизайн поли-CTL-эпитопных иммуногенов (C1, C2, C3) и кодирующих их генов (пояснения в тексте)

В соответствии с разработанной нами схемой все целевые гены, кодирующие HLA-A2-рестриктированные поли-CTL-эпитопные конструкции C1, C2 и C3, синтезировались с использованием частично перекрывающихся олигонуклеотидов-праймеров методом ПЦР (рис. 26). Во всех случаях предложена единообразная многоступенчатая схема блочной сборки целевых генов (рис. 26), которая была успешно реализована. В структуру концевых праймеров в каждом гене введены сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции *KpnI* и *PspEI* на 5'- и 3'-концах соответственно, для клонирования в составе любой векторной плазмиды (pV1 – pV3). Для обеспечения надежности сборки набора из девяти целевых рекомбинантных плазмид вначале генные конструкции C1, C2 и C3 были клонированы в составе вектора экспрессии pV2, правильность структуры встроенных генов подтверждали секвенированием, после чего целевые гены были реклонированы в составе других экспрессионных векторов – pV1 и pV3.



Для сборки гена C1 использовали 12 праймеров, C2 – 14, C3 - 17 праймеров. В структуре концевых олигонуклеотидов были сформированы сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции *KpnI* и *PspEI* на 5'- и 3'-концах соответственно для клонирования в составе любой из векторных плазмид - pV1, pV2, pV3.

Рисунок 26 – Схема синтеза генов, кодирующих конструкции C1, C2 и C3

Специфическая активность полученных ДНК-вакцинных конструкций оценивалась как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*. Было показано, что плазида, кодирующая иммуноген UbC3 (с Ub на N-конце химерной белковой молекулы), оказалась наиболее иммуногенной, так как она вызывала максимальную экспрессию комплексов [пептид-молекула МНС-I класса] на поверхности трансфецированных клеток, а также индуцировала ответы CD8+ CTL на большее количество пептидов по сравнению с другими плазидами. Клетки, трансфецированные плазидами, кодирующими химерные белки C2, C3, UbC2 и C3Ub, проявляли средний уровень экспрессии комплексов. Плазмиды, кодирующие белки UbC1, C1Ub и C2Ub, экспрессировали комплексы на низком уровне. Что касается плазмиды, кодирующей неоптимизированный полиэпитопный иммуноген C1, экспрессия комплексов [пептид-молекула МНС-I класса] была на уровне отрицательного контроля.

Сравнительный анализ иммуногенности спроектированных рекомбинантных плазмид показал статистически значимые различия между конструкциями, содержащими иммуногены C1, C2 и C3. При этом все конструкции, их содержащие, по иммуногенности были ранжированы как C3 > C2 > C1. Полученные результаты поддерживают концепцию, согласно которой убиквитин-зависимое нацеливание полиэпитопной конструкции на протеасому, а также ее оптимизация путем использования спейсерных последовательностей, содержащих сайты протеасомного расщепления и мотивы для связывания эпитопов с ТАР, обеспечивает рациональный дизайн полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов, нацеленный на повышение их иммуногенности. Работы в этом направлении в настоящее время продолжаются.

Разработка различных методов диагностики и подходов к вакцинопрофилактике Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ). Изучение возникающих и вновь возвращающихся вирусных инфекций является крайне актуальной проблемой современной вирусологии. В условиях появления в каком-либо регионе заболеваний с тяжелыми клиническими проявлениями особенно важным является быстрая идентификация возбудителя и определение путей его распространения, а также разработка современных эффективных средств вакцинопрофилактики.

Крымская–Конго геморрагическая лихорадка (ККГЛ) представляет собой острое инфекционное вирусное заболевание, сопровождающееся интоксикационным и геморрагическим синдромом и высокой летальностью (при тяжелых формах летальность может достигать 70 %). Это заболевание характеризуется частыми эпидемическими вспышками и спорадическими случаями, которые возникают во многих странах мира, включая Россию.

Вирус ККГЛ относится к семейству *Bunyaviridae*, роду *Nairovirus*. Геном вируса ККГЛ представлен тремя фрагментами одноцепочечной РНК отрицательной полярности. Нуклеотидная последовательность всего генома вируса ККГЛ определена как минимум для 15 штаммов вируса ККГЛ, и установлены полные и/или частичные последовательности L-, M- и S-сегментов генома десятков штаммов вируса.

Данные по генотипированию всегда лежат в основе разработки современных эффективных средств диагностики, вакцинопрофилактики и лечения. Кроме того, важно отметить, что вирус ККГЛ отнесен к агентам, которые имеют биотеррористический потенциал, вследствие его высокой вирулентности и

способности передаваться от человека к человеку. В этой связи огромное значение приобретают разработка методов относительно простого и быстрого генотипирования вируса ККГЛ и создание современных вакцинных препаратов, позволяющих избежать широкого распространения этого опасного заболевания.

Лабораторная диагностика ККГЛ основана на выявлении вируса и (или) его структурных компонентов, а также вирусоспецифических антител. Принято выделять три группы методов: вирусологические, иммунологические и молекулярно-генетические.

В последнее время для диагностики ККГЛ и генетической характеристики полученных изолятов и выделенных штаммов применяют молекулярно-генетические методы, основанные на проведении реакции обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией – ОТ-ПЦР. Данный метод позволяет выявлять вирусную РНК в течение первых дней заболевания, когда серологические методы не могут дать положительного результата, поскольку иммунный ответ в должной степени еще не сформирован. Более того, данный метод позволяет провести предварительное генотипирование биовариантов вируса путем прямого определения нуклеотидной последовательности полученных ПЦР-фрагментов его генома при условии, что выбранный район позволяет это адекватно осуществить.

Таким образом, нам представляется крайне актуальной задачей усовершенствование методов экспресс-диагностики ККГЛ, особенно в плане мониторинга ситуаций с возможными вспышками этого опасного заболевания в эндемичных по ККГЛ районах, прежде всего в южных регионах Российской Федерации и сопредельных территориях.

Одним из главных компонентов ИФА-диагностикумов, предназначенных для выявления антител к любому инфекционному агенту, является его антиген. Обычно используется два вида антигенов: лизатный либо рекомбинантный. Лизатный антиген, как правило, обладает высокой чувствительностью и достаточной специфичностью, однако получение подобного антигена в случае вируса ККГЛ сопряжено с риском заражения персонала. Поэтому разработка подходов к получению антигенов вируса ККГЛ в рекомбинантном виде – одно из приоритетных направлений в плане решения поставленной задачи.

Известно, что инфицированный организм вырабатывает большое количество антител к нуклеокапсидному (N) белку вируса ККГЛ, кодируемому S-сегментом генома, в меньшей степени – к поверхностному гликопротеину Gc, и совсем в незначительной – к другому гликопротеину Gn, кодируемому M-сегментом. Для оценки антигенных свойств N-белка нами была проведена серия экспериментов по его экспрессии в различных вариантах. В качестве матрицы мы использовали две рекомбинантные плазмиды, содержащие фрагменты кДНК S-сегмента генома вируса ККГЛ китайского штамма С68031, любезно предоставленные доктором Марриоттом (Marriott A.C.). Были рассчитаны и синтезированы праймеры, позволяющие получить и клонировать в различных экспрессионных векторах как фрагмент ДНК, кодирующий 1-359 а/к-фрагмент N-белка, так и полный N-белок (1-482 а/к).

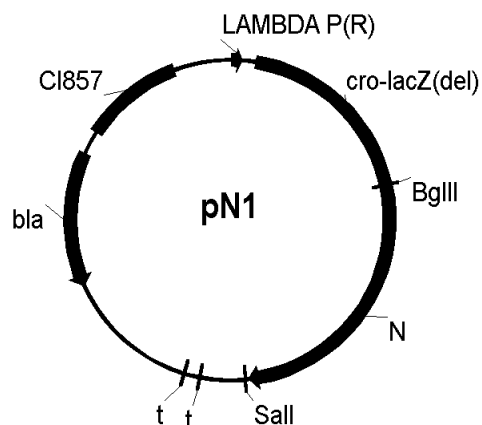
В результате нами была получена серия рекомбинантных плазмид, направляющих в клетках *E. coli* синтез следующих рекомбинантных белков: вышеназванного антигеннозначимого фрагмента N-белка как в чистом виде, так и в виде слитых белков с глутатион-S-трансферазой (GST) *Schistosoma japonicum* и

β -галактозидазой *E. coli*, а также полного N-белка, слитого с N-концевым фрагментом β -галактозидазы. В ИФА лучшие результаты были получены при использовании в качестве антигена рекомбинантного белка, состоящего из N-концевого фрагмента β -галактозидазы *E. coli* (около 40 кДа) и полного N-белка вируса ККГЛ, экспрессируемого в составе модифицированного вектора pUBEX.

Учитывая обнаруженную нами вариабельность в а/к последовательности N-белка вируса ККГЛ между штаммами, изолированными в Азии и европейской части России, мы получили аналогичный рекомбинантный белок штамма STV/HU29223, изолированного в Ставрополе от больного. Аналогичным образом была сконструирована плазмида pG1, направляющая в клетках *E. coli* синтез протяженного 1510-1670 а/к-фрагмента оболочечного белка-предшественника (входит в состав зрелого белка Gc) вируса ККГЛ штамма STV/TI28985 (изолирован от клеща).

На рисунке 27 представлена структура рекомбинантной плазмиды pN1. Все другие описанные здесь плазмиды имеют аналогичную структуру за исключением встроенного гена (N2, Gc).

Рисунок 27 – Структура рекомбинантной плазмиды pN1



Получение рекомбинантных белков вируса ККГЛ осуществляли в клетках *E. coli* RRI, трансформированных одной из целевых плазмид (pN1, pN2, pG1) путем активации термоиндуцибельного промотора P_R фага λ сдвигом температуры культивирования с 30 °С до 42 °С. Было

установлено, что все рекомбинантные белки накапливаются в составе нерастворимого осадка телец включений, который последовательно промывали растворами 2 М и 4 М мочевины и растворяли в 8 М мочеvine (рис. 28).

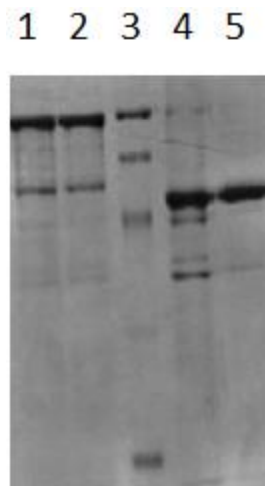
Далее была проведена оценка антигенных свойств методом ИФА следующих полученных нами рекомбинантных белков:

- N1 – полный N-белок китайского штамма С68031;
- N2 – полный N-белок штамма STV/HU29223 (Россия);
- G1 – 1510-1670 а/к-фрагмент оболочечного белка-предшественника штамма STV/TI28985 (Россия), входящего в состав гликопротеина Gc.

1 – N1 (8М мочеvина); 2 – N2 (8М мочеvина); 3 – маркерные белки: 97,4 кДа, 66,2 кДа, 45,0 кДа, 31,0 кДа, 21,5 кДа; 4 – G1 (4М мочеvина); 5 – G1 (8М мочеvина). Целевые белки представлены мажорными полосами в каждой из дорожек геля: около 94 кДа для N1 и N2 (дорожки 1 и 2), около 57 кДа для G1 (дорожки 4 и 5).

Рисунок 28 – Получение рекомбинантных белков вируса ККГЛ. Электрофореграмма. 12 % ПААГ

В качестве отрицательного контрольного антигена был взят рекомбинантный белок p24 ВИЧ-1, полученный нами в той же системе экспрессии и выделенный из клеточной биомассы аналогичным образом.



В эксперименте проводили определение антител класса IgG с использованием 16 положительных сывороток на ККГЛ. Белок N1 выявил как положительные 4 из них, белок N2 – 5, G1 – 2 (для p24 – 1). Для определения специфичности мы взяли случайную выборку из сывороток 48 здоровых доноров. Из них по 3 сыворотки оказались ложноположительными для всех белков вируса ККГЛ (для p24 – 1). Положительное взаимодействие (+) нами определялось по формуле: $OD^+/OD^- > 2$, где OD^+ - значение оптической плотности при A_{490} для тестируемой сыворотки, OD^- - среднее значение оптической плотности 3 контрольных отрицательных сывороток.

Таким образом, полученный рекомбинантный белок G1 следует признать неантигенным, то есть неспособным выявлять антитела к вирусу ККГЛ в сыворотках больных методом ИФА. Вероятно, антигенные свойства белка в значительной степени модулируются в результате его гликозилирования, отсутствующего в бактериальной клетке, а также определяются его конформационными эпитопами, формирующимися на поверхности вирусных частиц.

Несколько лучшие результаты были получены при использовании белка N, причем белки азиатского и российского штаммов отличались по взаимодействию с сыворотками больных ККГЛ, однако крайне низкая чувствительность (менее 30 %) при недостаточном показателе специфичности (около 90 %) ставит под сомнение возможность создания диагностической тест-системы для выявления антител к вирусу ККГЛ методом ИФА с использованием полученных рекомбинантных вирусных белков в качестве антигенов.

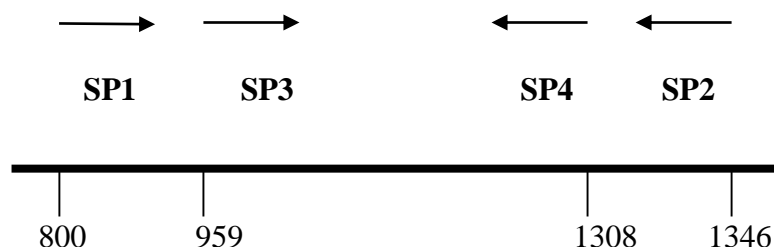
Тем не менее, полученные нами рекомбинантные антигены вируса ККГЛ могут найти, и уже находят, применение в решении других важных научных и практических задач, связанных с получением и использованием сывороток и высокоспецифичных МКА к белкам вируса ККГЛ, то есть выступать в роли вирусных иммуногенов либо служить инструментом для отбора МКА, специфичных к тем или иным белкам вируса ККГЛ, а сами рекомбинантные белки, в частности, нуклеокапсидный белок N, могут быть отличным положительным контролем в диагностических тест-системах по выявлению антигена вируса ККГЛ методом ИФА либо методом флуоресцирующих антител. Подобные МКА вместе с рекомбинантными вирусными белками могут служить надежным инструментом для выявления антигена вируса ККГЛ в биологических образцах. Работы в этом плане в настоящее время проводятся нами совместно с нашими коллегами из других научных организаций России, и эти результаты защищены тремя патентами РФ на изобретения.

Вместе с тем мы продолжили нашу работу по созданию надежной системы экспресс-диагностики ККГЛ, используя альтернативные подходы, одним из наиболее перспективных среди них является ОТ-ПЦР-диагностика. Данный метод применяется для диагностики ККГЛ уже более 15 лет во многих странах мира, однако быстрое накопление результатов изучения генетического разнообразия вируса неизбежно ставит задачи совершенствования существующих и создания новых тест-систем на основе ОТ-ПЦР. Принципиально предложенные системы детекции можно разделить на однораундовые (используется одна пара праймеров) и двухраундовые (используют две пары праймеров, причем вторая пара является вложенной (полностью или частично) внутрь ПЦР-фрагмента первого раунда). Каждый подход имеет свои преимущества и недостатки, которые определяются,

прежде всего, теми целями, которые разработчики считают приоритетными. Для нас главными целями при разработке являлись максимальные чувствительность и специфичность, а также информативность амплифицируемого фрагмента, т.е. возможность провести предварительное генотипирование по результатам его прямого секвенирования.

Таким образом, предложенный нами метод основан на использовании двух пар праймеров, фланкирующих консервативный кодирующий участок S-сегмента РНК вируса ККГЛ (рис. 29 и табл. 2), при проведении двухраундовой амплификации. Показано, что в условиях двухраундовой амплификации повышается специфичность и чувствительность определения РНК вируса ККГЛ в пробах различного происхождения. Специфичность реакции подтверждали прямым секвенированием ПЦР-продуктов, по результатам которого проводили надежное генотипирование изолятов вируса ККГЛ. Необходимо отметить, что предложенный набор праймеров был разработан на основе рассчитанного нами ранее аналогичного набора и большого массива новых данных по генетической variability вируса ККГЛ, полученных нами на его основе и появившихся в литературе.

Итак, предложенный набор праймеров для детекции РНК вируса ККГЛ в биологических образцах (клинических, полевых) является в известной степени универсальным, учитывающим особенности строения геномов всех известных генетических вариантов вируса. Причем с особым вниманием мы отнеслись к надежности выявления представителей основной европейской генетической группы, к которой относятся все биоварианты вируса ККГЛ, изолированные на территории Российской Федерации.



Цифрами обозначены позиции 5'-концевых нуклеотидов праймеров.

Рисунок 29 – Схема расположения праймеров для амплификации участка S-сегмента генома вируса ККГЛ

Таблица 2 – Структура набора праймеров для выявления РНК вируса ККГЛ

Нуклеотидная последовательность праймера (5'→3')	Наимено- вание	Положение на S-сегменте, нукл.
GAAGCCAA (A, G) AAGAC (T, C) GT (A, G) GAGGCTC	SP1	800 - 824
CAATTGTCTTGGC (A, G) CA (T, C) GGATT	SP2	1325 - 1346
GCACAGATTGACAC (T, C) (G, C) CTTTCAGC	SP3	959 - 982
GTCCG (T, A) AGGTT (A, G) AGAATGGACTTGGT	SP4	1283 - 1308

И, наконец, хотелось бы особо подчеркнуть, что условия ОТ-ПЦР разработаны с использованием ферментов и прибора для амплификации отечественного производства (ТП4-ПЦР-01-«Терцик», АО ДНК-Технология, Москва), что является важным обстоятельством, так как зарубежные наборы для ОТ-ПЦР и приборы для амплификации чрезвычайно дорогостоящи и не всегда доступны. Особую актуальность наш подход приобретает в связи со сложной политической ситуацией, накладывающей все больший отпечаток и на международное экономическое и научно-техническое сотрудничество.

Таким образом, нами разработана и внедрена в производство ОТ-ПЦР-тест-система для выявления РНК вируса ККГЛ в биологических образцах.

В настоящее время вирус ККГЛ подразделяется на семь генотипов, которые кластеризуются на филогенетическом дереве в основном по географическому принципу. Для корректного генотипирования необходимо использовать S- или L-сегмент, либо их фрагменты, хотя для более полной молекулярно-генетической характеристики изолятов вируса ККГЛ в дальнейшем необходимо и изучение структуры М-сегмента вирусного генома. Для решения поставленной задачи мы провели сканирование нуклеотидных последовательностей этих сегментов на наличие сайтов рестрикции, по которым можно было бы надежно генотипировать вирус ККГЛ, прежде всего, с целью выявления нетипичных представителей в ареале вируса ККГЛ генотипа Европа 1, основной территорией которого является Европейская часть России. Самым перспективным в этом плане оказался обнаруженный нами вариабельный район L-сегмента, фланкированный праймерами в прилегающих консервативных областях.

Для получения целевого фрагмента L-сегмента генома вируса ККГЛ, содержащего вариабельный участок, использовалась пара праймеров:

VFnew: 5'-GTRGTGAGCATTC AATAGAG -3' (pos. 2290-2309)

VRnew: 5'-CACCATCTRTCTGGYGGTGT - 3' (pos. 2680-2661).

R=A или G, Y=C или T.

Таким образом, длина фрагмента составляет 391 п.н.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей данного фрагмента для различных штаммов было выполнено с целью выявить идентичные. Всего в работе использовали 39 нуклеотидных последовательностей 35-ти различных штаммов, из них 16 являются представителями генетической группы Европа 1. Для всех были построены рестрикционные карты для эндонуклеаз рестрикции, сайты узнавания которых встречались неоднократно у представителей более двух генетических групп. Таким образом, были отобраны семь ферментов, из них окончательно выбрали два: *AluI* и *HaeIII*, позволяющие отличить штаммы вируса ККГЛ генетической группы Европа 1 от других.

Разработанная нами схема генотипирования представлена на рисунке 30. Однако необходимо к ней дать некоторые пояснения и комментарии. Суть предложенной схемы основана на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) после проведения ОТ-ПЦР. Здесь приводятся оценочные длины фрагментов с округлением до 5 п.н., т.к. речь идет о визуальной оценке длин рестрикционных фрагментов, и именно поэтому фрагменты ДНК длиной менее 40 п.н. мы опускаем при рассмотрении рестрикционных картин. Исключением в предложенной схеме является штамм Drosdov из России, который не несет сайта рестрикции *HaeIII* в этом фрагменте. Однако необходимо отметить, что данный штамм выделен около полувека назад и имеет очень длительную пассажную

историю, что не позволяет его отнести к современному генотипу вируса ККГЛ, циркулирующему на территории Европы. Вместе с тем обнаружение подобного геноварианта в природе в настоящее время было бы не менее интересно, чем выявление нехарактерных генотипических представителей вируса ККГЛ.

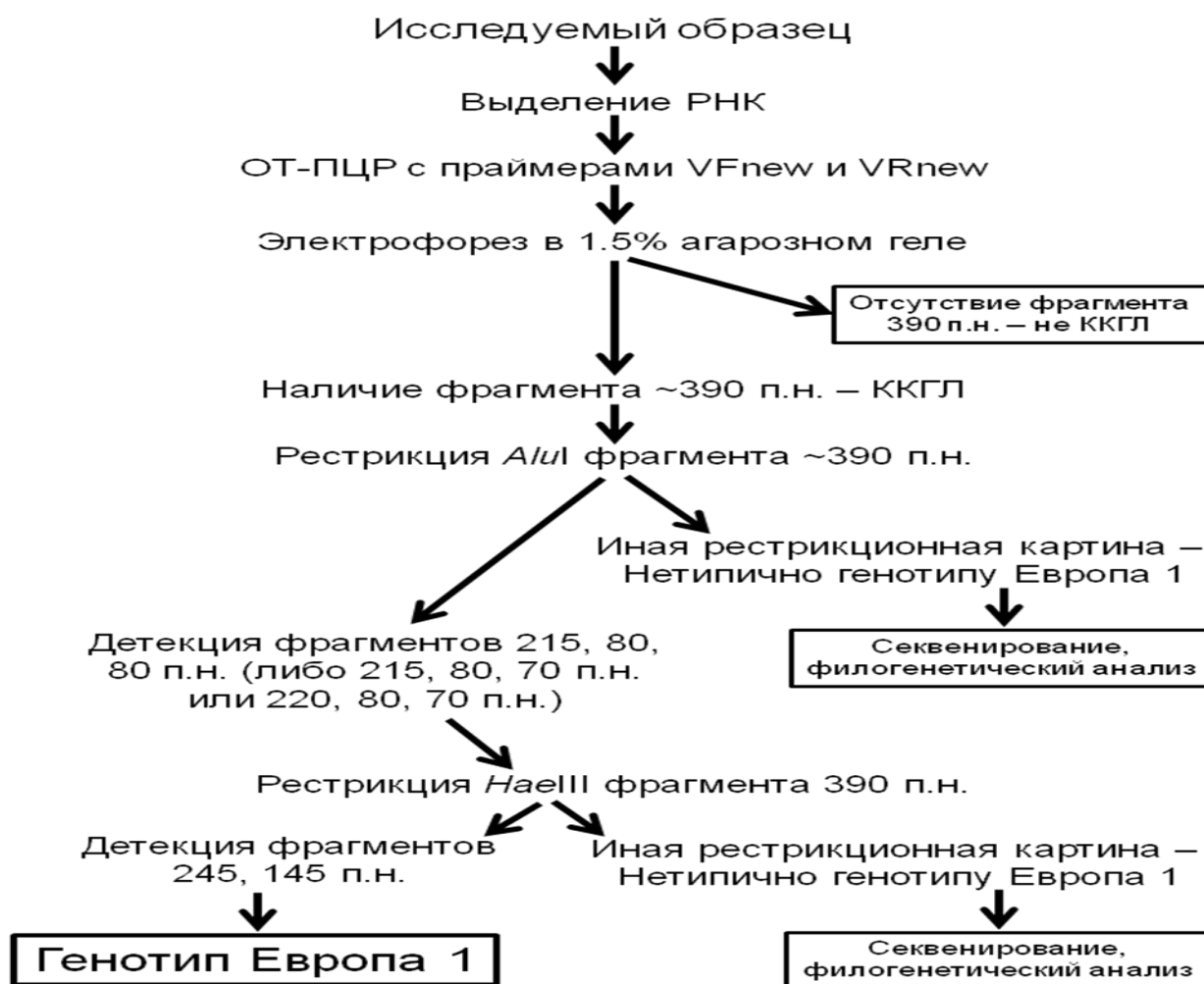


Рисунок 30 – Схема генотипирования вируса ККГЛ методом ПДРФ, позволяющая дифференцировать вирус основного европейского генотипа (Европа 1) от других, нехарактерных для Европы, генетических вариантов вируса

Таким образом, с помощью анализа ПДРФ можно с большой степенью вероятности дифференцировать вирус ККГЛ основного европейского генотипа от других генетических вариантов.

Вакцина для профилактики заболевания, вызываемого вирусом ККГЛ, была разработана и применялась в 1970-е годы в Советском Союзе и в Болгарии. Она представляет собой инактивированную вакцину, полученную на основе лизата мозгов мышей-сосунков, зараженных вирусом ККГЛ. В конце прошлого столетия на фоне ее применения в Болгарии удалось добиться снижения уровня заболеваемости ККГЛ в эндемичных районах. Однако иммунобиологические свойства этой вакцины до последнего времени не были в должной мере исследованы.

Недавно были опубликованы результаты такого исследования болгарской вакцины. Они свидетельствуют о существенной активации Т-клеточного звена иммунитета, направленного против вируса ККГЛ, которая возрастала на порядок при четырехкратной иммунизации по сравнению с однократной. В то же время добиться появления высокого уровня вируснейтрализующих антител не удалось, хотя общий уровень антивирусных иммуноглобулинов был достаточно высоким уже после первой иммунизации.

Учитывая опасность наличия остаточной вирулентности в препаратах вакцин такого типа и возможность серьезных осложнений в результате их использования, она не нашла широкого применения. На постсоветском пространстве, в том числе и в России, эта вакцина не применяется, в Болгарии ее использование ограничено группами риска в эндемичных по ККГЛ районах. Кроме того, производство подобной вакцины имеет свои ограничения, связанные с необходимостью проведения работ на высоком уровне биологической безопасности (BSL-4), что значительно затрудняет её выпуск в количествах, достаточных для вакцинации больших групп населения. Таким образом, перспективы крупномасштабного производства подобных вакцин в свете действующих современных стандартов выглядят невероятными.

В связи с вышеизложенным совершенно очевидно, что актуальность разработок по созданию новых, безопасных, вакцин против ККГЛ представляется несомненной.

Одним из приоритетных направлений в этой области является конструирование кандидатных ДНК-вакцин. Анализ литературных данных показал, что такие попытки предпринимались, однако их нельзя признать успешными. Так, например, Спик (Spik) и соавторы получили серию рекомбинантных плазмид, направляющих синтез поверхностных гликопротеинов ряда вирусов, в том числе и вируса ККГЛ. Авторы справедливо отмечают, что роль пептидных фрагментов, образующихся в результате сложного процессинга и созревания поверхностных гликопротеинов Gn и Gc в морфогенезе и патогенезе вируса неизвестна, поэтому они экспрессировали под контролем CMV-промотора ген белка-предшественника этих гликопротеинов. Было установлено, что синтезируемый предшественник подвергается правильному процессингу в эукариотических клетках, однако вируснейтрализующие антитела были обнаружены лишь у половины мышей, которых иммунизировали этой кандидатной ДНК-вакциной, причем картина была сходной в случае применения отдельно ДНК-вакцины против ККГЛ либо в смеси с другими ДНК-вакцинами (против хантавирусной инфекции, лихорадки долины Рифт, клещевого энцефалита). Авторы пришли к выводу, что можно добиться усиления ДНК-вакцинного потенциала за счет индивидуальной экспрессии генов зрелых поверхностных гликопротеинов, с чем нельзя не согласиться.

Вместе с тем, изучение внутриклеточной локализации гликопротеинов Gn и Gc выявило ряд сложных взаимодействий между ними в клетке в процессе созревания, что привело нас к мысли о целесообразности их совместного использования при конструировании кандидатных ДНК-вакцин, несмотря на низкую иммуногенность белка Gn по сравнению с Gc. Тем более что результаты тестов по нейтрализации *in vitro*, проведенные с помощью МКА к двум гликопротеинам (Gn и Gc), не коррелировали с уровнем защиты животных от летальных доз вируса ККГЛ: МКА к Gn лучше защищали мышей, чем МКА к Gc, в

то время как *in vitro* был получен прямо противоположный результат (по данным Bertolotti-Ciarlet с соавторами).

Мы, к сожалению, не знаем, какая составляющая иммунитета играет ключевую роль в защите от вируса ККГЛ, однако логично предположить, что клеточное звено иммунной системы инфицированного организма, особенно, активация CTL-ответов, играет далеко не последнюю роль в этом процессе. На наш взгляд, об этом свидетельствуют результаты, полученные другими авторами и описанные выше: при введении цельного вирусного антигена, обладающего хорошим вакцинным потенциалом, резко активизируется клеточный иммунитет; ДНК-вакцина, основанная на экспрессии гена предшественника поверхностных белков, полученная Спиком с соавторами, была неспособна вызывать эффективную наработку вируснейтрализующих антител.

Таким образом, анализ литературных данных и накопленный в этом направлении опыт работы укрепили нас в мысли получить, как минимум, три рекомбинантные плазмиды: две, кодирующие зрелые белки Gn и Gc, и плазмиду, направляющую синтез нуклеокапсидного (N) белка вируса ККГЛ, с целью изучения их вакцинного потенциала в различных сочетаниях.

Учитывая сконструированную нами ранее и описанную выше серию экспрессионных векторных плазмид pV1, pV2 и pV3, предназначенных для оценки различных аспектов вакцинного потенциала любых генетических конструкций, а также успешный опыт применения этих плазмид, мы приступили к разработке схемы экспериментов по получению рекомбинантных плазмид, направляющих в эукариотических клетках синтез всех трех основных иммуногенов – поверхностных гликопротеинов Gn и Gc и N-белка вируса ККГЛ.

К моменту начала работы по получению кандидатных ДНК-вакцинных конструкций против ККГЛ нами уже было установлено, что на территории Российской Федерации вирус ККГЛ представлен очень близкими биовариантами, относящимися к основной европейской генетической группе – Европа 1, тогда как в азиатских странах СНГ (Казахстан, Узбекистан, Таджикистан, Туркменистан) доминирует вирус, представленный одним из типичных азиатских генотипов. Нами были определены нуклеотидные последовательности всех сегментов генома вируса для ряда штаммов, причем для некоторых был расшифрован полный геном. При этом некоторые вирусные сегменты были нами получены в рекомбинантном виде в результате клонирования кДНК в составе плазмидных векторов в клетках *E. coli*.

Несмотря на то что по антигенному составу вирус ККГЛ достаточно консервативен, мы остановили свой выбор на плазмидных конструкциях, содержащих фрагменты генома штаммов вируса ККГЛ, типичных для территории России и выделенных относительно недавно в южных регионах страны и, что немаловажно, не имеющих длительной пассажной истории. Тем самым мы стремимся создать варианты кандидатных ДНК-вакцин, способных обеспечить максимальный уровень защиты в первую очередь для населения нашей страны. Ниже приводим характеристику использованного генетического материала.

Плазида pS1 длиной 4753 п.н., содержащая кДНК S-сегмента вируса ККГЛ. Источник ДНК – вирус ККГЛ, штамм STV/HU29223, кДНК геномного S-сегмента вируса, кодирующая N-белок, полноразмерная копия (1–1674 п.н.). Номер регистрации в GenBank: AF481802. Размер фрагмента (вставки) – 1690 п.н. с введенными по концам участками рестрикции *Bam*HI для удобства скрининга.

Вектор для клонирования – pGEM-T (Promega, США). Клонирование осуществлялось по выступающим Т-концам вектора в клетках *E. coli* XL1-Blue.

Плазмида pM1/10 длиной 5993 п.н., содержащая 5'-концевую половину кДНК геномного М-сегмента вируса ККГЛ. Источник ДНК – вирус ККГЛ, штамм VLG/TI29414, 5'-концевая половина кДНК геномного М-сегмента вируса, кодирующая поверхностный гликопротеин Gn. Координаты фрагмента – 1–2954 п.н. Номер регистрации в GenBank: AY179961. Размер фрагмента (вставки) – 2954 п.н. Вектор для клонирования – pGEM-T Easy (Promega, США). Клонирование осуществлялось по выступающим Т-концам вектора в клетках *E. coli* XL1-Blue.

Плазмида pM2/17 длиной 5514 п.н., содержащая 3'-концевую половину кДНК геномного М-сегмента вируса ККГЛ. Источник ДНК – вирус ККГЛ, штамм VLG/TI29414, 3'-концевая половина кДНК геномного М-сегмента вируса, кодирующая поверхностный гликопротеин Gc. Координаты фрагмента – 2886–5336 п.н. Номер регистрации в GenBank: AY179961. Размер фрагмента (вставки) – 2451 п.н. Вектор для клонирования – pGEM-T Easy (Promega, США). Клонирование осуществлялось по выступающим Т-концам вектора в клетках *E. coli* XL1-Blue.

Штамм STV/HU29223 выделен в 2000 г. от больного в Ставрополе (прошел 1 пассаж на культуре клеток SW-13). Штамм VLG/TI29414, также изолированный в 2000 г. от клеща *Hyalomma marginatum* в Волгограде (прошел 2 пассажа на клеточной культуре SW-13).

Описанные рекомбинантные плазмиды, содержащие копии фрагментов генома вируса ККГЛ, использовали в качестве матриц в реакции ПЦР для получения генов, кодирующих основные вирусные иммуногены: нуклеокапсидный белок N, поверхностные гликопротеины Gn и Gc. Для этого были рассчитаны праймеры, в структуру которых были заложены участки узнавания для рестриктаз *KpnI* и *PspEI* для клонирования в любой из векторных экспрессионных плазмид, сконструированных ранее и описанных выше – pV1, pV2, pV3.

На этапе клонирования предстояло определиться с векторной плазмидой, которая будет использована первой для получения кандидатных ДНК-вакцинных конструкций против ККГЛ. Очевидно, что в идеале было бы правильно проверить все возможные варианты развития иммунного ответа, которые могут обеспечить девять рекомбинантных плазмид. Однако такой объем экспериментальной работы с лабораторными животными представляется очень внушительным. Поэтому целесообразно выбрать какую-то одну экспрессионную векторную плазмиду, основываясь на определенных критериях, и после получения результатов по изучению иммуногенности этих кандидатных ДНК-вакцин скорректировать дальнейший ход исследований.

Векторная плазмида pV1 оптимизирована для эффективной экспрессии целевых генов, однако не несет никаких элементов, способствующих протеасом-опосредованному освобождению из рекомбинантных белков эпитопов, ответственных за индукцию CTL-ответов. То есть этот плазмидный вектор более подходит для экспрессии генов, продукты которых призваны активировать гуморальное звено иммунитета либо направлять его по пути Т-хелперов через взаимодействие с молекулами МНС-II класса.

Две другие векторные плазмиды обеспечивают генетическое присоединение к целевым иммуногенам последовательности убиквитина (Ub), который может способствовать транспорту такого химерного иммуногена в протеасому для

специфического процессинга с образованием коротких пептидов, играющих роль индукторов CTL-ответов после их презентации на поверхности АПК в комплексе с молекулами МНС-I класса, то есть являющихся, по сути, CTL-иммуногенами. Все свойства, схемы конструирования и апробация этой серии векторных плазмид подробно изложены выше.

Отличие между плазмидными векторами pV2 и pV3 состоит в расположении кодирующей последовательности Ub относительно целевого гена. Первые результаты по использованию этих векторных плазмид, изложенные выше, показали, что с указанной функцией лучше справляется Ub, располагаясь на N-конце (плазмида pV2) химерного иммуногена, тогда как его С-концевое расположение (плазмида pV3) в меньшей степени обеспечивает протеасом-опосредованное освобождение CTL-эпитопов.

Поскольку хотелось бы создать конструкции, обеспечивающие в равной, желательно высокой, степени активацию и клеточного, и гуморального звена иммунитета, на первом этапе мы приняли решение клонировать гены вируса ККГЛ в составе плазмидного вектора pV3, чтобы избежать слишком активного протеасомного расщепления иммуногенов, которое может направить иммунный ответ исключительно по Т-клеточному пути, с превалированием CTL-ответов, в ущерб развитию Т-хелперного пути и гуморального иммунитета.

Все три гена целевых вирусных иммуногенов были успешно клонированы в составе векторной плазмиды pV3, как это подробно описано выше для полиэпитопных иммуногенов, индуцирующих CTL-ответы против ВИЧ-1. Целевые рекомбинантные плазмиды, являющиеся кандидатными ДНК-вакцинами против ККГЛ, получили наименования: pV3N, pV3Gc и pV3Gn.

Первые эксперименты по изучению вакцинного потенциала кандидатных ДНК-вакцин, проведенные на мышах линии Balb/c, показали обнадеживающие результаты. Как и предполагалось, совместное введение рекомбинантных плазмид обеспечивает более высокие показатели как клеточного, так и гуморального иммунного ответа. В настоящее время подготовлен пакет документов, выпущена и заложена на хранение опытная серия кандидатной ДНК-вакцины против ККГЛ.

Таким образом, предложенный нами подход к созданию кандидатных ДНК-вакцин против ККГЛ, основанный на использовании сконструированной серии векторных экспрессионных плазмид, продемонстрировал обнадеживающие результаты, однако научно-поисковые работы в этом направлении, безусловно, требуют своего продолжения.

ВЫВОДЫ

1. Обоснована и впервые подтверждена экспериментально возможность использования кассеты «промотор гена *recA* *P. mirabilis* – полилинкер – терминатор транскрипции *t_{trpA}* *E. coli*» для эффективной экспрессии чужеродных генов в клетках *E. coli*. С использованием данной кассеты сконструирована экспрессионная векторная плазмида pRTU1, на основе которой получены продуценты ряда природных, мутантных и химерных иммуномодулирующих белков, в том числе:
 - интерлейкина-2 человека и двух его мутантных аналогов (уровень синтеза целевых рекомбинантных белков составил 45-55 мкг/мл бактериальной культуры);

- двух химерных белков ILA и AIL, состоящих из IL-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы (5-6 мкг/мл для AIL и 30-40 мкг/мл для ILA);
 - белка вируса натуральной оспы, гомологичного рецептору γ -интерферона человека, двух штаммов – высоковирулентного (India-1967) и низковирулентного (Garcia-1966) с содержанием целевых рекомбинантных белков 30-40 мкг в 1 мл бактериальной культуры;
 - ангиогенина человека (до 15 мкг/мл);
 - анафилатоксина C5a человека (до 2 мкг/мл).
2. Разработана и реализована оригинальная блочная схема синтеза искусственного гена TCI, кодирующего множественные CTL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1. Сконструированы рекомбинантные плазмиды pBK-RSV-TCI и pcDNA-TCI, обеспечивающие экспрессию этого гена в эукариотических клетках под контролем сильных вирусных промоторов (промотор из длинных концевых повторов вируса саркомы Рауса и предранний промотор цитомегаловируса соответственно). По результатам сравнительного изучения их иммуногенности была отобрана плазида pcDNA-TCI для разработки кандидатных вакцин против ВИЧ-1.
 3. На основе плазмиды pcDNA3.1/*myc*-His(-)/*lacZ* осуществлен авторский дизайн и конструирование серии экспрессионных векторов (pV1, pV2, pV3), обеспечивающих универсальность клонирования целевых генов, для изучения влияния на иммуногенность полученных ДНК-вакцинных конструкций убиквитинзависимого процессинга синтезируемых антигенов и презентации генерируемых эпитопов CD8+ Т-лимфоцитам по пути МНС-I класса.
 4. На основе векторов pV1, pV2, pV3 создан оригинальный набор рекомбинантных ДНК-вакцинных конструкций против ВИЧ-1 и ККГЛ, в том числе:
 - девять рекомбинантных плазмид, кодирующих структурные варианты полиэпитопных CTL-иммуногенов, обеспечивающих различные стратегии процессинга и презентации эпитопов ВИЧ-1;
 - три плазмиды, кодирующие структурные белки вируса ККГЛ (нуклеокапсидный белок N и зрелые поверхностные гликопротеины Gn и Gc), характерные для биовариантов, циркулирующих на территории России.
 5. Впервые разработана экспресс-диагностика ККГЛ, основанная на методах ОТ-ПЦР и ПДРФ, обеспечивающая надежное обнаружение вирусной РНК в биологических образцах и позволяющая проводить первичное генотипирование различных биовариантов вируса.
 6. Продемонстрировано, что полученный в работе рекомбинантный нуклеокапсидный белок N может быть использован в качестве положительного контрольного антигена при скрининге моноклональных антител к вирусу ККГЛ и как компонент диагностических тест-систем по обнаружению антигена вируса ККГЛ в клинических образцах методами ИФА и флуоресцирующих антител.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в научных журналах, рекомендованных ВАК

1. **Серегин С.В.**, Рябинин В.А., Синяков А.Н., Данилюк Н.К., Поздняков С.Г. Реконструкция синтетического гена интерлейкина-2 человека. // Биоорг. химия. – 1990. – Т. 16. – № 6. – С. 759-764.
2. Данилюк Н.К., **Серегин С.В.**, Синяков А.Н., Серпинский О.И., Бабкина И.Н., Урманова М.А., Рябинин В.А., Поздняков С.Г. Эффективный синтез и

- клонирование гена интерлейкина-2 человека и его аналога; экспрессия в клетках E. coli гена интерлейкина-2. // Биоорг. химия. – 1991. – Т. 17. – № 6. – С. 779-788.
3. **Серегин С.В.**, Сияяков А.Н., Поздняков С.Г., Камынина Т.П., Козлов Ю.В., Сахно Л.В., Сандахчиев Л.С. Новые гибридные белки – потенциальные иммуносупрессорные агенты. // ДАН. – 1992. – Т. 325. – № 5. – С. 1081-1084.
 4. **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Сияяков А.Н., Камынина Т.П., Ильюкова Л.В., Сахно Л.В. Эффективная экспрессия в клетках E.coli генов интерлейкина-2 человека и его мутантных аналогов. // Молекул. биол. – 1993. – Т. 27. – № 1. – С. 72-80.
 5. **Серегин С.В.**, Сияяков А.Н., Поздняков С.Г., Козлов Ю.В., Сахно Л.В., Леплина О.Ю., Номоконова Н.Ю. Получение гибридных белков, состоящих из интерлейкина-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы. // Молекул. биол. – 1993. – Т. 27. – № 4. – С. 763-772.
 6. Бабкина И.Н., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Сияяков А.Н., Гладкова С.Е., Поздняков С.Г. Химико-ферментативный синтез, клонирование и экспрессия гена аналога человеческого анафилотоксина C5a. // Биоорг. химия. – 1995. – Т. 21. – № 5. – С. 359-364.
 7. **Seregin S.V.**, Babkina I.N., Nesterov A.E., Sinyakov A.N., Shchelkunov S.N. Comparative studies of gamma-interferon receptor-like proteins of variola major and variola minor viruses. // FEBS Lett. – 1996. – V. 382. – № 1-2. – P. 79-83.
 8. **Серегин С.В.**, Бабкина И.Н., Нестеров А.Е., Сияяков А.Н., Щелкунов С.Н. Продукция в клетках E.coli белков натуральной оспы, гомологичных рецептору гамма-интерферона человека. // Молекул. биол. – 1996. – Т. 30. – № 3. – С. 692-700.
 9. **Серегин С.В.**, Бабкина И.Н., Нестеров А.Е., Сияяков А.Н., Щелкунов С.Н., Сандахчиев Л.С. Вирус натуральной оспы кодирует белок, подавляющий противовирусную активность гамма-интерферона человека. // ДАН. – 1996. – Т. 346. – № 1. – С. 122-124.
 10. Никонова А.А., **Серегин С.В.**, Чикаев Н.А., Мишин В.П., Бабкина И.Н., Мертвецов Н.П. Экспрессия синтетического гена ангиогенина человека в клетках E.coli. // Биоорг. химия. – 1996. – Т. 22. – № 12. – С. 891-893.
 11. Яшина Л.Н., Петров В.С., Вышемирский О.И., Аристова В.А., Москвина Т.М., Львов Д.К., Петрова И.Д., Гуторов В.В., Тюнников Г.И., Кузина И.И., Самохвалов Е.И., **Серегин С.В.**, Нетесов С.В. Характеристика вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующего в России и республиках Средней Азии. // Вопр. вирусол. – 2002. – Т. 47. – № 3. – С. 11-15.
 12. Яшина Л.Н., Петров В.С., Петрова И.Д., Гуторов В.В., Казаков С.В., Оспанов К.С., Каримов С.К., Тюнников Г.И., **Серегин С.В.**, Кузина И.И., Бабкин И.В., Нетесов С.В. Генетическая идентификация вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки во время эпидемической вспышки в Казахстане в 2000 г. // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. – 2002. – № 4. – С. 31-35.
 13. Петрова И.Д., **Серегин С.В.**, Петров В.С., Вышемирский О.И., Кузина И.И., Львов Д.К., Самохвалов Е.И., Тюнников Г.И., Гуторов В.В., Яшина Л.Н., Нетесов С.В. Генетическая характеристика S-сегмента РНК двух штаммов вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, изолированных на юге России и в Узбекистане. // Вопр. вирусол. – 2003. – Т. 48. – № 2. – С. 8-11.
 14. Yashina L., Petrova I., **Seregin S.**, Vyshemirskii O., Lvov D., Aristova V., Kuhn J., Morzunov S., Gutorov V., Kuzina I., Tyunnikov G., Netesov S., Petrov V. Genetic variability of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Russia and Central Asia. // J. Gen. Virol. – 2003. – V. 84. – Pt 5. – P. 1199-1206.
 15. Yashina L., Vyshemirskii O., **Seregin S.**, Petrova I., Samokhvalov E., Lvov D., Gutorov V., Kuzina I., Tyunnikov G., Tang Y.-W., Netesov S., Petrov V. Genetic analysis

- of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Russia. // J. Clin. Microbiol. – 2003. – V. 41. – № 2. – P. 860-862.
16. **Seregin S.V.**, Samokhvalov E.I., Petrova I.D., Vyshemirskii O.I., Samokhvalova E.G., Lvov D.K., Gutorov V.V., Tyunnikov G.I., Shchelkunov S.N., Netesov S.V., Petrov V.S. Genetic characterization of the M RNA segment of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains isolated in Russia and Tajikistan. // Virus Genes. – 2004. – V. 28. – № 2. – P. 187-193.
 17. **Серегин С.В.**, Туманова И.Ю., Вышемирский О.И., Петрова И.Д., Львов Д.К., Громашевский В.Л., Самохвалов Е.И., Тюнников Г.И., Гуторов В.В., Тишкова Ф.Х., Данияров О.А., Нетесов С.В., Петров В.С. Изучение генетической вариабельности вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующего в странах Средней Азии. // ДАН. – 2004. – Т. 398. – № 5. – С. 705-708.
 18. Kuhn J.H., **Seregin S.V.**, Morzunov S.P., Petrova I.D., Vyshemirskii O.I., Lvov D.K., Tyunnikov G.I., Gutorov V.V., Netesov S.V., Petrov V.S. Genetic analysis of the M RNA segment of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains involved in the recent outbreaks in Russia. // Arch. Virol. – 2004. – V. 149. – № 11. – P. 2199-2213.
 19. Бажан С.И., Белавин П.А., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Бабкина И.Н., Карпенко Л.И., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Агафонов А.П., Игнатьев Г.М., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С. Конструирование искусственного иммуногена, кандидата ДНК-вакцины, кодирующей множественные CTL-эпитопы ВИЧ-1. // ДАН. – 2004. – Т. 395. – № 6. – С. 825-827.
 20. Bazhan S.I., Belavin P.A., **Seregin S.V.**, Danilyuk N.K., Babkina I.N., Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Lebedev L.R., Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Poryvaeva V.A., Aborneva I.V., Ilyichev A.A. Designing and engineering of DNA-vaccine construction encoding multiple CTL epitopes of major HIV-1 antigens. // Vaccine. – 2004. – V. 22. – № 13-14. – P. 1672-1682.
 21. Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Ilyichev A.A., Lebedev L.R., Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Zaitsev B.N., Belavin P.A., **Seregin S.V.**, Danilyuk N.K., Babkina I.N., Bazhan S.I., Comparative analysis of the immunogenicity of artificial VLP and attenuated *Salmonella* strain carrying a DNA-vaccine encoding HIV-1 polyepitope CTL-immunogen. // Vaccine. – 2004. – V. 22. – № 13-14. – P. 1692-1699.
 22. Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Игнатьев Г.М., Агафонов А.П., Белавин П.А., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Бажан С.И. Использование различных систем доставки ВИЧ-1 ДНК-вакцины, кодирующей поли-CTL-эпитопный иммуноген. // Вестник РАМН. – 2005. – № 1. – С. 41-44.
 23. Онищенко Г.Г., Туманова И.Ю., Вышемирский О.И., Kuhn J., **Серегин С.В.**, Тюнников Г.И., Петрова И.Д., Тишкова Ф.Х., Оспанов Х.С., Казаков С.В., Каримов С.К., Есмагамбетова А.С., Нетесов С.В., Петров В.С. Исследование вирусофортности иксодовых клещей в очагах Крымской-Конго геморрагической лихорадки Казахстана и Таджикистана. // Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. – 2005. – № 1. – С. 27-31.
 24. Онищенко Г.Г., Туманова И.Ю., Вышемирский О.И., Kuhn J., **Серегин С.В.**, Тюнников Г.И., Петрова И.Д., Тишкова Ф.Х., Оспанов Х.С., Казаков С.В., Каримов С.К., Есмагамбетова А.С., Нетесов С.В., Петров В.С. Исследование методами ИФА и ОТ-ПЦР вирусофортности иксодовых клещей, собранных в очагах Крымской-Конго геморрагической лихорадки Казахстана и Таджикистана в 2001-2002 гг. // Вопр. вирусол. – 2005. – Т. 50. – № 1. – С. 23-26.
 25. **Серегин С.В.**, Туманова И.Ю., Петрова И.Д., Яшина Л.Н., Кузина И.И., Вышемирский О.И., Гуторов В.В., Серегин С.С., Тюнников Г.И., Самохвалов Е.И., Львов Д.К., Нетесов С.В., Петров В.С. Особенности S-сегмента генома вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующего в России и Болгарии. // Вопр. вирусол. – 2006. – Т. 51. – № 3. – С. 25-32.

26. Туманова И.Ю., **СерEGIN С.В.**, Вышемирский О.И., Гуторов В.В., Петрова И.Д., Тюнников Г.И., Оспанов К.С., Казаков С.В., Каримов С., Тишкова Ф.Х., Пиров А.П., Нетесов С.В., Петров В.С. Генетический мониторинг вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки в Казахстане и Таджикистане в период 2001-2003 гг. // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. – 2006. – № 2. – С. 36-41.
27. Meissner J.D., Seregin S.S., **Seregin S.V.**, Vyshemieskii O.J., Yakimenko N.V., Netesov S.V., Petrov V.S. The complete genomic suguence of Strain ROS/HUVLV-100, a representative Russian Crimean Congo hemorrhagic fever virus strain. // Virus Genes. – 2006 – V. 33. – № 1. – P. 87-93.
28. Meissner J.D., Seregin S.S., **Seregin S.V.**, Vyshemirskii O.I., Samokhvalov E.I., Lvov D.K., Netesov S.V., Petrov V.S. A variable region in the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus L segment distinguishes between strains isolated from different geographic regions. // J. Med. Virol. – 2006. – V. 78. – № 2. – P. 223-228.
29. Meissner J.D., Seregin S.S., **Seregin S.V.**, Vyshemirskii O.I., Samokhvalov E.I., Lvov D.K., Netesov S.V., Petrov V.S. Complete L segment coding-region sequences of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains from the Russian Federation and Tajikistan. // Arch. Virol. – 2006. – V. 151. – № 3. – P. 465-475.
30. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Ерошкин А.М., Лебедев Л.Р., Ужаченко Р.В., Некрасова Н.А., Плясунова О.А., Белавин П.А., **СерEGIN С.В.**, Данилюк Н.К., Даниленко Е.Д., Зайцев Б.Н., Масычева В.И., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С. Вакцина “КомбиВИЧвак”, содержащая В- и Т-клеточные иммуногены ВИЧ-1. // ДАН. – 2007. – Т. 413. – № 4. – С. 553-556.
31. Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Eroshkin A.M., Lebedev L.R., Uzhachenko R.V., Nekrasova N.A., Plyasunova O.A., Belavin P.A., **Seregin S.V.**, Danilyuk N.K., Zaitsev B.N., Danilenko E.D., Masicheva V.I., Bazhan S.I. Combined virus-like particle-based polyepitope DNA/protein HIV-1 vaccine. Design, immunogenicity and toxicity studies. // Vaccine. – 2007. – V. 25. – № 21. – P. 4312-4323.
32. Bazhan S.I., Karpenko L.I., Ilyicheva T.N., Belavin P.A., **Seregin S.V.**, Danilyuk N.K., Antonets D.V., Ilyichev A.A. Rational design based synthetic polyepitope DNA vaccine for eliciting HIV-specific CD8+ T cell responses. // Mol. Immunol. – 2010. – V. 47. – № 7-8. – P. 1507-1515.
33. **СерEGIN С.В.**, СерEGIN С.С., Петров В.С., Тюнников Г.И., Якименко Н.В., Сергеев А.Н. Дифференциация генетических вариантов вирусов Крымской-Конго геморрагической лихорадки. // Вопр. вирусол. – 2011. – Т. 56. – № 1. – С. 30-33.
34. **СерEGIN С.В.**, Петров В.С., Гришаев М.П. Методы диагностики Крымской-Конго геморрагической лихорадки. // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. – 2013. – № 4. – С. 26-31.
35. Храпова Н.П., Антонов В.А., Булатова Т.В., Пименова Е.В., Корсакова И.И., Голосеев Ю.А., Пьянков О.В., Пьянков С.А., **СерEGIN С.В.**, Плясунов И.В., Сафронов П.Ф., Петров В.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н., Дятлов И.А., Шемякин И.Г., Белова Е.В. Получение моноклональных антител и перспективы их использования в качестве основы иммунодиагностических средств обнаружения вируса Крым-Конго геморрагической лихорадки. // Пробл. особо опасных инфекций. – 2015. – Вып. 1. – С. 89-93.

Патенты

1. Петров В.С., Петрова И.Д., Тюнников Г.И., **СерEGIN С.В.**, Яшина Л.Н., Кузина И.И. Набор олигонуклеотидов-праймеров для идентификации РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки. Патент РФ на изобретение № 2209830 от 20.08.2001.

2. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Некрасова Н.А., Белавин П.А., Данилюк Н.К., **Серегин С.В.**, Бабкина И.Н., Игнатьев Г.М., Агафонов А.П., Бойченко М.Н., Воробьев А.А., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С. Рекомбинантная плазмидная ДНК pcDNA-TCl, обеспечивающая экспрессию искусственного гена TCl в клетках эукариот, и рекомбинантный аттенуированный штамм бактерий *Salmonella enteritidis* E-23/pcDNA-TCl как кандидат для конструирования живой ДНК-вакцины против вируса иммунодефицита человека. Патент РФ на изобретение № 2248396 от 17.04.2003.
3. Бажан С.И., Белавин П.А., **Серегин С.В.**, Бабкина И.Н., Данилюк Н.К., Сандахчиев Л.С. Искусственный белок-иммуноген TCl, содержащий множественные CTL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1, искусственный ген TCl, кодирующий полиэпитопный белок-иммуноген TCl. Патент РФ на изобретение № 2238946 от 27.10.2004.
4. **Серегин С.В.**, Петров В.С., Туманова И.Ю., Петрова И.Д., Тюнников Г.И. Набор олигонуклеотидных праймеров для идентификации РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки в полевых и клинических образцах. Патент РФ на изобретение № 2294963 от 03.03.2005.
5. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Лебедев Л.Л., Некрасова Н.А., Белавин П.А., **Серегин С.В.**, Данилюк Н.К., Ерошкин А.М., Ильичев А.А. Рекомбинантная вакцина против вируса иммунодефицита человека 1 типа. Патент РФ на изобретение № 2317107 от 10.01.2006.
6. Антонов В.А., Храпова Н.П., Булатова Т.В., Пименова Е.В., Косакова И.И., Пьянков О.В., Пьянков С.А., **Серегин С.В.**, Плясунов И.В., Сафронов П.Ф., Петров В.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н., Дятлов И.А., Шемякин И.Г., Белова Е.В. Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus musculus* L. CSHFV-Vd-1 – продуцент моноклонального антитела 4G₄/B₆ к вирусу Крым-Конго геморрагической лихорадки. Патент РФ на изобретение № 2535982 от 10.10.2013.
7. Антонов В.А., Храпова Н.П., Булатова Т.В., Пименова Е.В., Косакова И.И., Пьянков О.В., Пьянков С.А., **Серегин С.В.**, Плясунов И.В., Сафронов П.Ф., Петров В.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н., Дятлов И.А., Шемякин И.Г., Белова Е.В. Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus musculus* L. CSHFV-Vd-2 – продуцент моноклонального антитела 1E₂/E₅ к вирусу Крым-Конго геморрагической лихорадки. Патент РФ на изобретение № 2528868 от 10.10.2013.
8. Антонов В.А., Храпова Н.П., Булатова Т.В., Пименова Е.В., Косакова И.И., Пьянков О.В., Пьянков С.А., **Серегин С.В.**, Плясунов И.В., Сафронов П.Ф., Петров В.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н., Дятлов И.А., Шемякин И.Г., Белова Е.В. Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus musculus* L. CSHFV-Vd-3 – продуцент моноклонального антитела 3H₆/F₂ к вирусу Крым-Конго геморрагической лихорадки. Патент РФ на изобретение № 2528869 от 10.10.2013.