

Изучение иммуногенности рекомбинантного фрагмента ортопоксвирусного белка р35

Я.А. Хлусевич¹, А.А. Матвеев^{1, 2}, Е.П. Гончарова¹, И.К. Байков¹, Н.В. Тикунова^{1, 2} 

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru

Несмотря на ликвидацию натуральной оспы, ортопоксвирусы продолжают оставаться источником биологической опасности для людей, так как в природе циркулируют вирусы оспы коров и оспы обезьян, причем последний способен вызывать не только спорадические случаи заболеваний человека, но и вспышки оспоподобной инфекции. Кроме того, периодическая вакцинация необходима для представителей определенных профессий (ученые, изучающие патогенные ортопоксвирусы, медицинские работники и др.). Ослопрививание – вакцинация живым вирусом осповакцины, которое широко использовалось при ликвидации натуральной оспы, обеспечивает формирование у вакцинированных людей длительного иммунитета. Однако, давая достаточно надежную защиту, ослопрививание нередко сопровождается серьезными поствакцинальными осложнениями, вероятность возникновения которых особенно велика для лиц со сниженным иммунным статусом. В связи с этим разработка препаратов для профилактики и лечения инфекций, вызванных ортопоксвирусами, актуальна и в настоящее время. Цель данного исследования – оценка иммуногенности в мышинной модели рекомбинантного белка р35Δ12, сконструированного на основе белка р35 вируса оспы коров. Ранее было показано, что белок р35Δ12 связывается с высоким сродством с полноразмерным вируснейтрализующим анти-ортопоксвирусным антителом человека. В настоящей работе рекомбинантный белок р35Δ12, наработанный в клетках *E. coli* XL1-blue и очищенный хроматографически, использовали для двукратной иммунизации мышей. Через две недели после второй иммунизации у мышей брали образцы крови и анализировали находящиеся в сыворотке антитела. Методами иммуноферментного и вестерн-блот анализа было показано, что сыворотки иммунизированных животных содержали антитела класса IgG, направленные к рекомбинантному белку р35Δ12. Методом конфокальной микроскопии показано, что антитела, индуцированные белком р35Δ12, способны узнавать клетки Vero E6, зараженные вирусом осповакцины ЛИВП-GFP. Кроме того, находящиеся в сыворотках иммунизированных мышей антитела могут нейтрализовать инфекционность вируса осповакцины ЛИВП-GFP в реакции ингибирования бляшкообразования *in vitro*.
Ключевые слова: белок р35 ортопоксвирусов; вирус оспы коров; рекомбинантный белок; иммунизация; конфокальная микроскопия.


Для цитирования: Хлусевич Я.А., Матвеев А.А., Гончарова Е.П., Байков И.К., Тикунова Н.В. Изучение иммуногенности рекомбинантного фрагмента ортопоксвирусного белка р35. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):398-404. DOI 10.18699/VJ19.508

Immunogenicity of recombinant fragment of orthopoxvirus p35 protein in mice

Ya.A. Khlusevich¹, A.L. Matveev^{1, 2}, E.P. Goncharova¹, I.K. Baykov¹, N.V. Tikunova^{1, 2} 

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru

Despite the elimination of smallpox, orthopoxviruses continue to be a source of biological danger for humans, as cowpox and monkey pox viruses circulate in nature and the last virus can cause both sporadic cases of human diseases and outbreaks of smallpox-like infection. In addition, periodic vaccination is necessary for representatives of some professions (scientists studying pathogenic orthopoxviruses, medical personnel, etc.). Vaccination against smallpox virus with live vaccinia virus, which was widely used during the elimination of smallpox, induces the formation of long-term immunity in vaccinated people. However, providing a high level of protection, the vaccination is often accompanied by serious post-vaccination complications, the probability of which is particularly great for individuals with compromised immunity. In this regard, the development of preparations for the prevention and treatment of infections caused by orthopoxviruses remains important today. The aim of this study was to assess the immunogenicity in the mouse model of recombinant protein p35Δ12, designed previously on the base of the cowpox virus protein p35. It was previously shown that the

protein p35Δ12 was recognized by fully human neutralizing anti-orthopoxviral antibody with high affinity. In this work, recombinant protein p35Δ12 produced in *E. coli* cells XL1-blue and purified by chromatography was used for two-time immunization of mice. Two weeks after the second immunization, blood samples were taken from mice and serum antibodies were analyzed. It was shown by ELISA and Western-blot analysis that immunized mice sera contained IgG antibodies specific to recombinant protein p35Δ12. Confocal microscopy showed that antibodies induced by the p35Δ12 protein were able to recognize Vero E6 cells infected with the LVP-GFP vaccinia virus. In addition, the antibodies in the serum of immunized mice were able to neutralize the infectivity of the vaccinia virus LVP-GFP in the plaque reduction neutralization test *in vitro*. These experiments have demonstrated promising properties of the p35Δ12 protein if it were used as a component of vaccine for prophylaxis of orthopoxvirus infections.

Key words: p35 orthopoxvirus protein; cowpox virus; recombinant protein; immunization; confocal microscopy.

For citation: Khlusevich Ya.A., Matveev A.L., Goncharova E.P., Baykov I.K., Tikunova N.V. Immunogenicity of recombinant fragment of orthopoxvirus p35 protein in mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(4):398-404. DOI 10.18699/VJ19.508 (in Russian)

Введение

Представители рода *Orthopoxvirus* (семейство Poxviridae) – это сложные ДНК-содержащие вирусы, реплицирующиеся в цитоплазме зараженных клеток и имеющие свои собственные механизмы регуляции репликации и транскрипции (Shchelkunov et al., 2005; Moss, 2013). Ортопоксвирусы различаются по спектру хозяйской специфичности: существуют вирусы с широкой хозяйской специфичностью – вирус оспы коров (ВОК), вирус оспы обезьян (ВОО); есть вирусы, способные заражать только одного хозяина – вирус экстремелии (ВЭ), вирус натуральной оспы (ВНО) (Buller et al., 1986; Shchelkunov et al., 2005). Несколько представителей этого рода являются патогенными для человека; ВНО и ВОО могут вызвать генерализованное заболевание (Jezek et al., 1986; MacNeil et al., 2009; Smith, 2013; McCollum, Damon, 2014; Nakazawa et al., 2015), тогда как инфекция вирусом осповакцины (ВОВ) или ВОК обычно приводит лишь к локальному повреждению кожи (Moss, 2013).

Несмотря на то что естественная трансмиссия ВНО была прекращена, ортопоксвирусы продолжают оставаться источником биологической опасности для людей, так как в природе циркулируют ортопоксвирусы, способные инфицировать человека. Так, ВОО может вызывать как спорадические случаи оспоподобного заболевания человека, так и вспышки этой инфекции (Di Giulio, Eckburg, 2004; Rimoin et al., 2010; Reynolds et al., 2013). Кроме того, постоянно регистрируются случаи заболеваний людей оспой коров и вакциноподобным заболеванием (Zafar et al., 2007; Campe et al., 2009; Carletti et al., 2009; Ninove et al., 2009; Silva-Fernandes et al., 2009; Trindade et al., 2009; Bhanuprakash et al., 2010; Ducournau et al., 2013; Riyesh et al., 2014; Nobi et al., 2015; Kinnunen et al., 2015). Однако в связи с ликвидацией натуральной оспы массовое оспопрививание (вакцинация живым ВОВ) было прекращено во второй половине 1970-х гг., и в настоящее время большинство населения не имеет иммунитета к ортопоксвирусным инфекциям. Прививка живым ВОВ приводит к формированию у вакцинированных людей длительного иммунитета (Crotty et al., 2003). Вместе с тем, давая достаточно надежную защиту, оспопрививание нередко сопровождается серьезными поствакцинальными осложнениями, вероятность возникновения которых особенно велика для лиц со сниженным иммунным статусом (Fulginiti et al., 2003; Kawakami et al., 2009). В связи

с этим не прекращаются разработки препаратов для профилактики и лечения инфекций, вызванных ортопоксвирусами.

С появлением рекомбинантных технологий возникло новое направление в вакцинологии – применение отдельных антигенов вместо целых патогенов. Такой подход позволяет сфокусировать иммунный ответ на более значимых мишенях. Предполагается, что иммунизация определенным рекомбинантным белком, несущим наиболее иммуногенные эпитопы, могла бы индуцировать наработку эффективных антител, как при классической вакцинации. Действительно, субъединичные вакцины в настоящее время активно разрабатываются и уже используются в практике (Bazzill et al., 2018; Medina et al., 2018; Shi et al., 2018; Wang et al., 2018).

Ранее для исследования эпитопной специфичности анти-ортопоксвирусного полноразмерного антитела человека fh1A, способного нейтрализовать инфекционность вируса осповакцины, был сконструирован рекомбинантный белок p35Δ12 (Khlusevich et al., 2018), представляющий фрагмент белка p35 вируса оспы коров. Характер взаимодействия вируснейтрализующего антитела с белком p35Δ12 позволил предположить наличие вируснейтрализующего эпитопа в последовательности этого рекомбинантного белка. Цель данного исследования – оценка способности белка p35Δ12 индуцировать образование вируснейтрализующих антител у мышей.

Материалы и методы

Рекомбинантный белок p35Δ12, сконструированный ранее (Khlusevich et al., 2018), нарабатывали в клетках *Escherichia coli* XL1-blue, трансформированных плазмидой pQE30-Δ12 и индуцированных 0.2 мМ изопропил тио-галактозидом (ИПТГ). Белок p35Δ12 очищали из цитоплазмы трансформированных клеток с помощью аффинной хроматографии с использованием носителя Ni-NTA Sepharose. Мономерную фракцию белка отделяли хроматографически на колонке с носителем Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare). Очищенный белок p35Δ12 концентрировали в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР, 100 мМ NaCl, 50 мМ Na₂HPO₄, pH 7.4) с использованием фильтров Amicon Ultra-4 10K (Millipore).

Эксперименты с животными проводили в соответствии с рекомендациями по защите животных, используемых в научных целях (Директива EU2010/63/EU). Все экспе-

рименты с животными были одобрены комитетом по биоэтике Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия. Мышей размещали в пластиковых клетках при нормальном цикле день/ночь. Вода и еда были предоставлены *ad libitum*.

Для иммунизации использовали самок мышей BALB/c возраста 5–6 недель, приобретенных в питомнике Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (р.п. Кольцово, Россия). Очищенный белок p35Δ12 разводили в ФСБР и вводили интраперитонеально в дозировке 10 мкг на мышь одновременно с полным адьювантом Фрейнда (Sigma, США), общий объем инъекции – 500 мкл. Через 2 недели иммунизацию повторяли, заменив полный адьювант Фрейнда неполным адьювантом (Sigma). Через 14 дней после второй иммунизации собирали кровь из лицевой вены.

Сыворотку выделяли из свернувшихся образцов крови центрифугированием, после чего образцы сыворотки инкубировали 30 мин при 56 °С для инактивации белков комплемента. Эффективность иммунизации оценивали иммуноферментным анализом (ИФА) и вестерн-блот анализом.

Для выявления анти-p35Δ12 антител в сыворотках иммунизированных мышей в лунки 96-луночного полистиролового планшета («Медполимер», Россия) сорбировали белок p35Δ12 в ФСБР, 200 нг/лунку. После удаления несвязавшегося антигена лунки промывали ФСБР, участки неспецифического связывания блокировали 5 % раствором обезжиренного молока в ФСБР в течение 1 ч, после чего лунки снова промывали ФСБР с 0.1 % Tween 20. Затем в лунки вносили последовательные разведения сывороток мышей в ФСБР, начиная с разведения 1:200, с шагом разведения 1:2. Планшеты инкубировали 1 ч при 37 °С. Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли конъюгатом поликлональных антител козы против IgG (H+L) мыши со щелочной фосфатазой (Sigma) в разведении 1:8000. Затем лунки последовательно промывали ФСБР с 0.2 % Tween 20 и AP-буфером (100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 100 мМ Трис-HCl, pH 9.5); иммунные комплексы окрашивали пара-нитрофенилфосфатом в AP-буфере.

Для проведения вестерн-блот анализа лизат клеток *E. coli*, продуцирующих белок p35Δ12, фракционировали электрофоретически в 12.5 % полиакриламидном геле с 0.1 % додецилсульфатом натрия и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Sigma), которую после блокирования сайтов неспецифического связывания 5 % раствором обезжиренного молока в ФСБР инкубировали с мышинными сыворотками, разведенными 1:200 в ФСБР с 0.1 % Tween 20. Связавшиеся антитела выявляли конъюгатом поликлональных антител козы против IgG (H+L) мыши со щелочной фосфатазой (Sigma) в разведении 1:8000. Визуализацию иммунного комплекса проводили, добавляя 5-бromo-3-индолил фосфат и нитро-тетразолиевый голубой. В качестве положительного контроля использовали полноразмерное антитело человека fh1A, специфичное к белку p35 ортопоксвирусов (Khlusevich et al., 2018), которое инкубировали аналогично мышинным сывороткам, но выявляли с помощью поликлональных антител козы против IgG (H+L) человека (Sigma).

В экспериментах по оценке взаимодействия сывороток мышей с жизнеспособными вирионами ВОВ использовали штамм ЛИВП-GFP, в котором ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP), встроен в состав гена тимидинкиназы (Петров и др., 2013).

Для проведения лазерно-сканирующей микроскопии суспензию ВОВ (280 БОЕ), штамм ЛИВП-GFP (Петров и др., 2013), разведенную в 100 мкл питательной среды DMEM с 2 % эмбриональной сывороткой, добавляли к монослою клеток Vero E6, выращенных в 35 мм чашках Петри для микроскопии (Ibidi, Германия), и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Затем клетки три раза отмывали питательной средой. Через 2 дня зараженные клетки фиксировали 10 % раствором формалина, промывали ФСБР и блокировали 3 % бычьим сывороточным альбумином 1 ч при 37 °С. Далее к фиксированным клеткам добавляли сыворотки иммунизированных мышей в ФСБР в разведении 1:200 и инкубировали 1 ч при 37 °С. После промывания клеток стерильным ФСБР связавшиеся антитела выявляли поликлональными антителами козы против IgG (H+L) мыши, конъюгированными с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 633. Через час инкубации клетки промывали стерильным ФСБР и добавляли 300 нМ раствор DAPI (Life Technologies, США) в ФСБР для окрашивания клеточных ядер. В качестве отрицательного контроля использовали нормальную мышиную сыворотку.

В качестве положительного контроля использовали полноразмерное анти-p35 антитело человека fh1A (Khlusevich et al., 2018), которое инкубировали аналогично мышинным сывороткам, но выявляли с помощью поликлональных антител козы против IgG (H+L) человека, конъюгированных с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 633.

Изображения специфического взаимодействия антител с клетками, зараженными ВОВ ЛИВП-GFP, получали с помощью конфокального микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) с 20-кратным объективом. Флуоресцентные метки DAPI, GFP и Alexa Fluor 633 возбуждали на длинах волн 405, 488 и 633 нм соответственно; эмиссию детектировали на длинах волн 440–480, 490–530 и 630–700 нм соответственно. Получение и обработку изображений выполняли в пакете программ ZEN black edition (Carl Zeiss).

Для оценки вируснейтрализующей активности сывороток мышей, иммунизированных очищенным белком p35Δ12, суспензию ВОВ, штамм ЛИВП-GFP (Петров и др., 2013), разведенную в питательной среде DMEM с 2 % сывороткой телят, смешивали в равном объеме с различными разведениями мышинных сывороток и инкубировали 1 ч при 37 °С. После этого смесь наслаивали на монослой клеток Vero E6 в 24-луночных культуральных планшетах (TPP, Швейцария). Через 2 ч смесь удаляли, клетки промывали средой DMEM и культивировали в питательной среде DMEM с 2 % сывороткой телят при 37 °С. В контрольные лунки вносили суспензию вируса без добавления мышинной сыворотки. Через несколько дней клетки окрашивали 0.1 % кристаллическим фиолетовым в 10 % растворе формальдегида и подсчитывали бляшки. Уровень нейтрализации рассчитывали по формуле $N = (V_0 - V_n) / V_0 \times 100 \%$, где V_0 – среднее количество бляшек в контрольных лунках, а V_n – количество бляшек в экспериментальных лунках.

Результаты

Рекомбинантный белок р35Δ12, наработанный в клетках *E. coli* XL1-blue, очищали из фракции растворимых цитоплазматических белков (рис. 1, а). При очистке целевого белка с помощью аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA сефарозы вместе с белком р35Δ12 с молекулярной массой около 30 кДа соочищался клеточный белок с молекулярной массой около 25 кДа (см. рис. 1, а). Вестерн-блот анализ очищенного белка р35Δ12 подтвердил его способность взаимодействовать с полноразмерным антителом человека fh1A, направленным к ортопоксвирусному белку р35; дополнительный белок с молекулярной массой около 25 кДа антителом fh1A не выявлялся (см. рис. 1, б).

Очищенный белок р35Δ12 использовали для иммунизации мышей BALB/c. Иммунизацию проводили по так называемой короткой схеме: белок вводили дважды в дозировке 10 мкг на мышшь с интервалом в 2 недели. Из образцов крови, собранных через 7 дней после второй иммунизации, отделили сыворотку и оценили наличие в ней антител против белка р35Δ12. Данные ИФА подтвердили наличие специфических антител в сыворотках иммунизированных мышей (рис. 2). Кроме того, эти сыворотки выявляли белок р35Δ12, перенесенный на нитроцеллюлозную мембрану, в вестерн-блот анализе (см. рис. 1, б).

Для визуализации взаимодействия находящихся в сыворотках иммунизированных мышей анти-р35Δ12 антител с клетками, зараженными ортопоксвирусом, использовали лазерно-сканирующую микроскопию. В экспериментах применяли сконструированный ранее ВОВ, штамм ЛИВП-GFP (Петров и др., 2013), при размножении которого в цитоплазме зараженных клеток накапливается белок GFP и клетки окрашиваются в зеленый цвет при возбуждении светом с длиной волны 488 нм и детекции в диапазоне длин волн 490–530 нм. Клетки Vero E6 заражали ВОВ ЛИВП-GFP и обрабатывали сыворотками иммунизированных мышей и нормальной мышьиной сывороткой (отрицательный контроль). Мышиные антитела выявляли конъюгатом антивидовых антител с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 633. Этот флуорофор возбуждается светом с длиной волны 633 нм, и объекты, меченные Alexa Fluor 633, окрашиваются красным цветом при детекции в световой области 630–700 нм.

Результаты конфокальной микроскопии, представленные на рис. 3, однозначно свидетельствуют о способности сыворотки иммунизированных мышей выявлять зараженные клетки. Видно, что меченные Alexa Fluor 633 антитела, направленные к суммарному IgG мышши, локализуются на поверхности зараженных клеток (окрашены зеленым) и не выявляют незараженные клетки Vero E6. Полноразмерное антитело fh1A, выявленное мечеными Alexa Fluor 633 антителами, направленными к суммарному IgG человека, также выявляет клетки, зараженные ВОВ ЛИВП-GFP.

Для проверки способности рекомбинантного белка р35Δ12 вызывать наработку антител, обладающих вируснейтрализующими свойствами, исследовали вируснейтрализующую активность сывороток иммунизированных мышей. В экспериментах для заражения клеток Vero E6 также использовали вирус ВОВ ЛИВП-GFP. При инкуба-

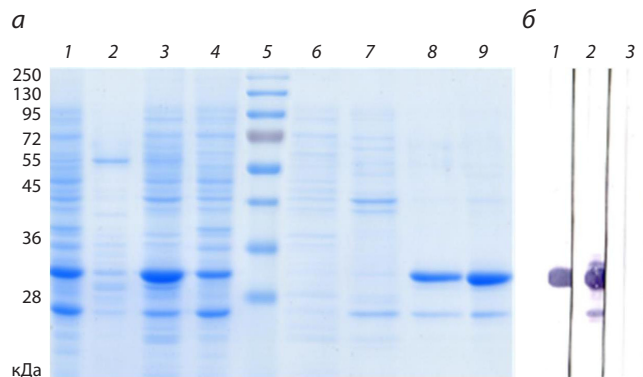


Рис. 1. Электрофореграмма в 12.5 % SDS-ПААГ клеточных и белковых фракций *E. coli* XL1-blue/pQE30-Δ12 (а) и вестерн-блот анализ очищенного белка р35Δ12 (б).

Дорожки в геле: 1 – индуцированная культура клеток *E. coli* XL1-blue/pQE30-Δ12; 2 – периплазматическая фракция; 3 – фракция растворимых белков цитоплазмы; 4 – фракция телец включения; 5 – маркеры молекулярных масс; 6 – фракция белков, не связавшихся с Ni-NTA; 7 – элюат 25 мМ имидазолом; 8 – элюат 100 мМ имидазолом; 9 – концентрированный очищенный белок р35Δ12. Стрипы нитроцеллюлозной мембраны с перенесенным белком р35Δ12, проявленные: 1 – fh1A; 2 – объединенной сывороткой иммунизированных мышей; 3 – нормальной мышьиной сывороткой.

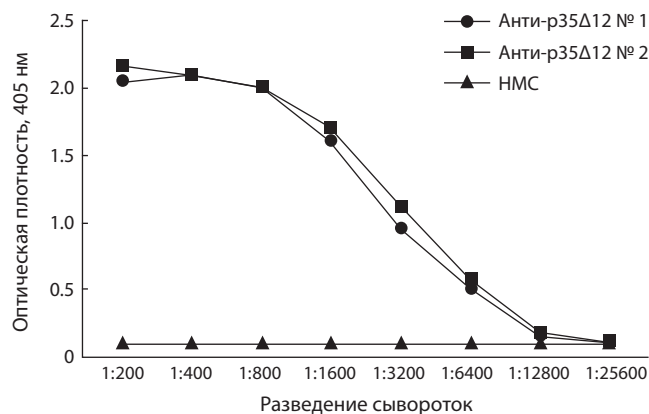


Рис. 2. Иммуноферментный анализ связывания сыворотками иммунизированных мышей и нормальной мышьиной сывороткой (НМС) с белком р35Δ12.

ции этого вируса с различными разведениями мышьиных сывороток обнаружено снижение инфекционности вируса более чем на 50 % при разведении сывороток 1:20 и 1:100 (рис. 4). Нормальная мышьиная сыворотка, полученная от неиммунизированного животного, такой способностью не обладала (см. рис. 4).

Обсуждение

Широкое применение вакцин на основе живого ВОВ позволило победить натуральную оспу – одно из самых опасных инфекционных заболеваний в истории человечества. Однако после ликвидации натуральной оспы Всемирная организация здравоохранения в 1980 г. рекомендовала прекратить применение вакцин на основе живого вируса осповакцины из-за относительно большого числа серьезных осложнений и побочных эффектов. Использование классических вакцин для массовой вакцинации, вероятно,

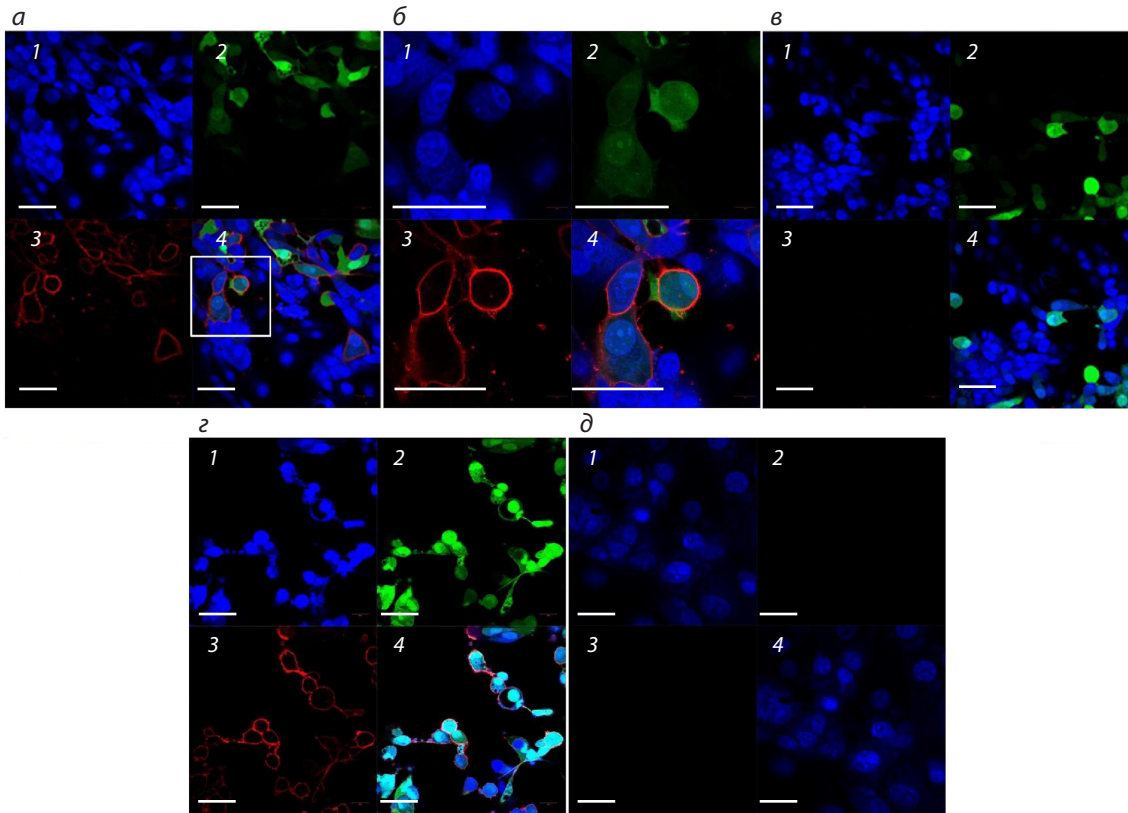


Рис. 3. Конфокальная микроскопия клеток Vero E6, зараженных вирусом осповакцины ЛИВП-GFP.

Монослой зараженных клеток инкубировали с сыворотками мышей, иммунизированных белком p35Δ12 (а, б), с нормальной мышиной сывороткой (в) и с полноразмерным антителом человека fh1A (г). В качестве отрицательного контроля приведен монослой незараженных клеток, инкубированный с сыворотками мышей, иммунизированных белком p35Δ12 (д). Связавшиеся антитела выявляли антивидовыми конъюгатами антител козы против IgG мыши или человека с Alexa Fluor 633. Дополнительно препараты окрашивали DAPI для выявления клеточных ядер. Изображения взаимодействия антител с клетками получали с помощью конфокального микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия), масштабная шкала соответствует 10 мкм. 1 – сигнал канала DAPI; 2 – сигнал канала GFP; 3 – сигнал канала Alexa Fluor 633; 4 – совмещенное изображение.

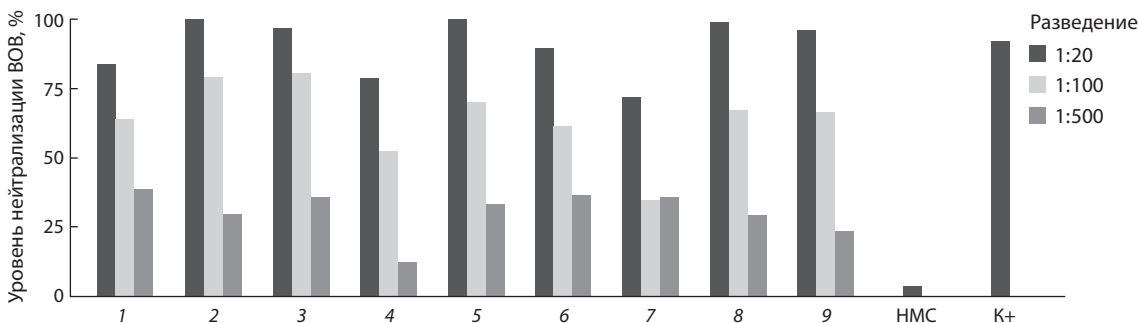


Рис. 4. Нейтрализация различными разведениями сывороток мышей, иммунизированных белком p35Δ12, бляшкообразования вируса осповакцины ЛИВП-GFP на культуре клеток Vero E6.

Приведены результаты вируснейтрализующей активности сывороток девяти иммунизированных мышей, а также нормальной мышиной сыворотки (отрицательный контроль) и сыворотки многократно вакцинированного вирусом осповакцины ЛИВП добровольца (положительный контроль), разведенными в 20 раз.

привело бы к возрастанию числа осложнений, поскольку в последние годы у все большего числа людей регистрируются различного рода нарушения иммунитета. Вместе с тем необходимость в вакцинах, защищающих от ортопоксвирусов, не исчезла, поскольку в природе по-прежнему существуют патогенные для человека ортопоксвирусы, и вспышка оспы обезьян в США из-за вируса, чей природный резервуар находится на другом континенте, доказала

это. Кроме того, периодическая вакцинация необходима для представителей определенных профессий (ученые, изучающие патогенные ортопоксвирусы, медицинские работники и др.) (Petersen et al., 2016).

Разработка вакцин на основе высокоаттенуированных вирусов осповакцины, не способных размножаться в клетках человека (Meyer et al., 1991), привела к получению вакцин MVA и LC16m8 (Meyer et al., 1991; Kidokoro et al.

2005), которые крайне редко вызывают побочные реакции и могут применяться даже для вакцинации индивидуумов с ослабленным иммунитетом (Olson, Shchelkunov, 2017). Эти вакцины не вызывают длительного напряженного иммунитета, и целесообразно использовать для первой вакцинации (Olson, Shchelkunov, 2017; Shchelkunova, Shchelkunov, 2017). В связи с этим продолжаются попытки создания различных вариантов противоспешных вакцин, включая ДНК-вакцины и вакцины на основе генно-инженерных вариантов вируса осповакцины (детально рассмотрено в обзоре (Shchelkunova, Shchelkunov, 2017)). Одним из перспективных подходов является получение субъединичных вакцин для разработки стратегии безопасной вакцинации, включающей на первом этапе вакцинацию субъединичной вакциной, после чего можно было бы применять вакцины на основе аттенуированных ортопоксвирусов. Для создания субъединичных вакцин необходимо детальное исследование потенциальных иммуногенов.

При оспопрививании или инфицировании ортопоксвирусами в организме человека нарабатываются антитела против широкого спектра белков, экспрессируемых на разных стадиях инфекции, причем наряду с мембранными оболочечными белками, которые доступны благодаря их расположению на поверхности вирусной частицы, нарабатываемые антитела специфически взаимодействуют и с коровыми белками вириона (Jones-Trower et al., 2005). В случае ортопоксвирусов наиболее значимыми для формирования иммунитета у человека являются белки B5R, A27L и р35 (Pütz et al., 2006). Первый белок экспонирован на поверхности EEV (внеклеточный оболочечный вирус), а белки A27L и р35 – на поверхности IMV (внутриклеточный зрелый вирус). Антитела против этих белков обладают вируснейтрализующими и протективными свойствами (Pütz et al., 2006). Ранее нами был сконструирован химерный белок р35 вируса оспы коров, содержащий на N-конце β-галактозидазу (Дубровская и др., 2007). Позднее был получен рекомбинантный белок р35Δ12, содержащий с 1 по 239 аминокислотные остатки белка р35 вируса оспы коров, и показано, что вируснейтрализующие антитела человека распознают этот белок с высокой эффективностью (Khlusevich et al., 2018).

Заключение

В настоящем исследовании доказано, что белок р35Δ12, созданный на основе белка р35 вируса оспы коров, при введении в мышей индуцирует у них образование антител, которые способны не только узнавать клетки, зараженные вирусом осповакцины, но и нейтрализовать инфекционность вируса осповакцины в экспериментах *in vitro*. При изучении иммунологических свойств полноразмерной формы рекомбинантного белка р35 осповакцины (Lin et al., 2000; Davies et al., 2005) обнаружено, что сыворотки, полученные от иммунизированных животных, также обладали вируснейтрализующими свойствами. Однако в указанных работах исследователи использовали для иммунизации рекомбинантный полноразмерный белок р35 в дозировках, превышающих на порядок дозировку, использованную в нашей работе. Следует отметить, что даже так называемая короткая схема иммунизации – двукратное введение ре-

комбинантного белка р35 в низкой дозировке, обеспечила индукцию вируснейтрализующих антител.

Проведенные эксперименты продемонстрировали высокую иммуногенность белка р35Δ12 и целесообразность его возможного использования в качестве компонента субъединичной вакцины или вовлечения гена, кодирующего р35, в ДНК-вакцину. Вместе с тем требуются дальнейшие детальные исследования *in vivo* для оценки протективных свойств белка р35Δ12 и предпочтительных схем иммунизации, обеспечивающих защиту мышей от ортопоксвирусных инфекций.

Список литературы / References

- Дубровская В.В., Улитин А.Б., Ламан А.Г., Гилева И.П., Бормотов Н.И., Ильичев А.А., Бровко Ф.А., Щелкунов С.Н., Беланов Е.Ф., Тикунова Н.В. Конструирование комбинаторной иммунной клонотекки одноцепочечных антител человека против ортопоксвирусов и селекция из нее антител к рекомбинантному белку рA30L вируса натуральной оспы. Молекуляр. биология. 2007;41(1):173-185.
- [Dubrovskaya V.V., Ulitin A.B., Laman A.G., Gileva I.P., Bormotov N.I., Il'ichev A.A., Brovko F.A., Schelkunov S.N., Belanov E.F., Tikunova N.V. Construction of combinatorial immune library of human single-chain antibodies to orthopoxviruses and selection of antibodies to recombinant prA30L of the variola virus. Mol. Biol. 2007;41(1):157-167. DOI 10.1134/S0026893307010207.]
- Петров И.С., Гончарова Е.П., Колосова И.В., Поздняков С.Г., Щелкунов С.Н., Зенкова М.А., Власов В.В. Противоопухолевое действие рекомбинантного вируса осповакцины L1VP-GFP. Докл. АН. 2013;451(5):592-597. DOI 10.7868/S0869565213240274.
- [Petrov I.S., Goncharova E.P., Kolosova I.V., Pozdnyakov S.G., Shchelkunov S.N., Zenkova M.A., Vlasov V.V. Antitumor effect of the L1VP-GFP recombinant vaccinia virus. Doklady Biological Sciences. 2013;451:248-252. DOI 10.1134/S0012496613040133.]
- Bazzill J.D., Ochyl L.J., Giang E., Castillo S., Law M., Moon J.J. Interrogation of antigen display on individual vaccine nanoparticles for achieving neutralizing antibody responses against hepatitis C virus. Nano Lett. 2018;18:7832-7838. DOI 10.1021/acs.nanolett.8b03601.
- Bhanuprakash V., Venkatesan G., Balamurugan V., Hosamani M., Yogisharadhya R., Gandhale P., Reddy K.V., Damle A.S., Kher H.N., Chandel B.S., Chauhan H.C., Singh R.K. Zoonotic infections of buffalopox in India. Zoonoses Public Health. 2010;57(7-8):e149-155.
- Buller R.M., Potter M., Wallace G.D. Variable resistance to ectromelia (mousepox) virus among genera of *Mus*. Curr. Top Microbiol. Immunol. 1986;127:319-322.
- Campe H., Zimmermann P., Glos K., Bayer M., Bergemann H., Dreweck C., Graf P., Weber B.K., Meyer H., Büttner M., Busch U., Sing A. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. Emerg. Infect. Dis. 2009;15(5):777-780.
- Carletti F., Bordi L., Castilletti C., Di Caro A., Falasca L., Gioia C., Ippolito G., Zaniratti S., Beltrame A., Viale P., Capobianchi M.R. Cat-to-human orthopoxvirus transmission, northeastern Italy. Emerg. Infect. Dis. 2009;15(3):499-500.
- Crotty S., Felgner P., Davies H., Glidewell J., Villarreal L., Ahmed R. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. J. Immunol. 2003;171:4969-4973.
- Davies D.H., McCausland M.M., Valdez C., Huynh D., Hernandez J.E., Mu Y., Hirst S., Villarreal L., Felgner P.L., Crotty S. Vaccinia virus H3L envelope protein is a major target of neutralizing antibodies in humans and elicits protection against lethal challenge in mice. J. Virol. 2005;79:11724-11733.
- Di Giulio D.B., Eckburg P.B. Human monkeypox: an emerging zoonosis. Lancet Infect. Dis. 2004;4(1):15-25.
- Ducourneau C., Ferrier-Rembert A., Ferraris O., Joffre A., Favier A.L., Flusin O., Van Cauteren D., Kecir K., Auburtin B., Védy S., Bessaud M., Peyrefitte C.N. Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases, France, 2011. Emerg. Infect. Dis. 2013;19(12):1996-1999.

- Fulginiti V.A., Papier A., Lane J.M., Neff J.M., Henderson D.A. Smallpox vaccination: a review, part II. Adverse events. *Clin. Infect. Dis.* 2003;37:251-271.
- Hobi S., Mueller R.S., Hill M., Nitsche A., Löscher T., Guggemos W., Ständer S., Rjosk-Dendorfer D., Wollenberg A. Neurogenic inflammation and colliquative lymphadenitis with persistent orthopox virus DNA detection in a human case of cowpox virus infection transmitted by a domestic cat. *Br. J. Dermatol.* 2015;173(2):535-539.
- Jezek Z., Marennikova S.S., Mutumbo M., Nakano J.H., Paluku K.M., Szczeniowski M. Human monkeypox: a study of 2,510 contacts of 214 patients. *J. Infect. Dis.* 1986;154(4):551-555.
- Jones-Trower A., Garcia A., Meseda C.A., He Y., Weiss C., Kumar A., Weir J.P., Merchlinsky M. Identification and preliminary characterization of vaccinia virus (Dryvax) antigens recognized by vaccinia immune globulin. *Virology.* 2005;343:128-140.
- Kawakami Y., Tomimori Y., Yumoto K., Hasegawa S., Ando T., Tagaya Y., Crotty S., Kawakami T. Inhibition of NK cell activity by IL-17 allows vaccinia virus to induce severe skin lesions in a mouse model of eczema vaccinatum. *J. Exp. Med.* 2009;206(6):1219-1225.
- Khlusevich Y., Matveev A., Baykov I., Bulychyev L., Bormotov N., Ilyichev I., Shevelev G., Morozova V., Pyshnyi D., Tikunova N. Phage display antibodies against ectromelia virus that neutralize variola virus: selection and implementation for p35 neutralizing epitope mapping. *Antiviral Res.* 2018;152:18-25. DOI 10.1016/j.antiviral.2018.02.006.
- Kidokoro M., Tashiro M., Shida H. Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102(11):4152-4157.
- Kinnunen P.M., Holopainen J.M., Hemmilä H., Piiparinen H., Sironen T., Kivelä T., Virtanen J., Niemimaa J., Nikkari S., Järvinen A., Vapalahti O. Severe ocular cowpox in a human, Finland. *Emerg. Infect. Dis.* 2015;21(12):2261-2263.
- Lin C.L., Chung C.S., Heine H.G., Chang W. Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* 2000;74:3353-3365.
- MacNeil A., Reynolds M.G., Carroll D.S., Karem K., Braden Z., Lash R., Moundeli A., Mombouli J.V., Jumaan A.O., Schmid D.S., Damon I.K. Monkeypox or maricella? Lessons from a rash outbreak investigation in the Republic of the Congo. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009;80(4):503-507.
- McCollum A.M., Damon I.K. Human monkeypox. *Clin. Infect. Dis.* 2014;58(2):260-267.
- Medina L.O., To A., Lieberman M.M., Wong T., Namekar M., Nakano E., Andersen H., Yalley-Ogunro J., Greenhouse J., Higgs S., Huang Y.S., Vanlandingham D.L., Horton J.S., Clements D.E., Lehrer A.T. A recombinant subunit based Zika virus vaccine is efficacious in non-human primates. *Front. Immunol.* 2018;9:2464. DOI 10.3389/fimmu.2018.02464.
- Meyer H., Sutter G., Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J. Gen. Virol.* 1991;72:1031-1038.
- Moss B. Poxviridae. In: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.). *Fields Virology*. Six ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2013; 2129-2159.
- Nakazawa Y., Mauldin M.R., Emerson G.L., Reynolds M.G., Lash R.R., Gao J., Zhao H., Li Y., Muyembe J.J., Kingebeni P.M., Wemakoy O., Malekani J., Karem K.L., Damon I.K., Carroll D.S. A phylogeographic investigation of African monkeypox. *Viruses.* 2015;7(4):2168-2184.
- Ninove L., Domart Y., Vervel C., Voinot C., Salez N., Raoult D., Meyer H., Capek I., Zandotti C., Charrel R.N. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(5):781-784.
- Olson V., Shchelkunov S. Are we prepared in case of a possible smallpox-like disease emergence? *Viruses.* 2017;9(9):242.
- Petersen B.W., Harms T.J., Reynolds M.G., Harrison L.H. Use of vaccinia virus smallpox vaccine in laboratory and health care personnel at risk for occupational exposure to orthopoxviruses – recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2015. *Morb. Mortal. Wkly Rep. (MMWR).* 2016;65(10):257-262. DOI 10.15585/mmwr.mm6510a2.
- Pütz M.M., Midley C.M., Law M., Smith G.L. Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious of vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccinations. *Nat. Med.* 2006;12(11):1310-1315.
- Reynolds M.G., Emerson G.L., Pukuta E., Karhemere S., Muyembe J.J., Bikindou A., McCollum A.M., Moses C., Wilkins K., Zhao H., Damon I.K., Karem K.L., Li Y., Carroll D.S., Mombouli J.V. Detection of human monkeypox in the Republic of the Congo following intensive community education. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013;88(5): 982-985.
- Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kusalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Okitolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107(37):16262-16267.
- Riyesh T., Karuppusamy S., Bera B.C., Barua S., Virmani N., Yadav S., Vaid R.K., Anand T., Bansal M., Malik P., Pahuja I., Singh R.K. Laboratory-acquired buffalopox virus infection, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2014;20(2):324-326.
- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. *Orthopoxviruses Pathogenic for Humans*. Berlin; Heidelberg; New York: Springer, 2005.
- Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N. 40 years without smallpox. *Acta Naturae.* 2017;9(4):4-12.
- Shi D.Y., Chen B.Y., Mao Y.Y., Zhou G., Lu J.S., Yu Y.Z., Zhou X.W., Sun Z.W. Development and evaluation of candidate subunit vaccine against botulinum neurotoxin serotype B. *Hum. Vaccin. Immunother. Publ. online* 2018. *Publ.* 2019;15(3):755-760. DOI 10.1080/21645515.2018.1547613.
- Silva-Fernandes A.T., Travassos C.E., Ferreira J.M., Abrahão J.S., Rocha E.S., Viana-Ferreira F., dos Santos J.R., Bonjardim C.A., Ferreira P.C., Kroon E.G. Natural human infections with *Vaccinia virus* during bovine vaccinia outbreaks. *J. Clin. Virol.* 2009;44(4):308-313.
- Smith K.A. Smallpox: can we still learn from the journey to eradication? *Indian J. Med. Res.* 2013;137(5):895-899.
- Trindade G.S., Guedes M.I., Drumond B.P., Mota B.E., Abrahão J.S., Lobato Z.I., Gomes J.A., Corrêa-Oliveira R., Nogueira M.L., Kroon E.G., da Fonseca F.G. Zoonotic vaccinia virus: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient. *Clin. Infect. Dis.* 2009;48(3):e37-40.
- Wang Y.B., Wang L.P., Li P. Perspectives on novel vaccine development. *Pol. J. Vet. Sci.* 2018;21(3):643-649.
- Zafar A., Swanepoel R., Hewson R., Nizam M., Ahmed A., Husain A., Grobbelaar A., Bewley K., Mioulet V., Dowsett B., Easterbrook L., Hasan R. Nosocomial buffalopoxvirus infection, Karachi, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* 2007;13(6):902-904.

ORCID ID

Ya.A. Khlusevich orcid.org/0000-0002-1413-5876
A.L. Matveev orcid.org/0000-0002-6884-6104
N.V. Tikunova orcid.org/0000-0002-1687-8278

Благодарности. Работа выполнена при поддержке РФФ, проект № 16-14-00083.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.11.2018. После доработки 04.03.2019. Принята к публикации 22.03.2019.