

Игнатъева Г.А.¹, Корнилаева Г.В.², Мельникова Т.М.³, Сорокина Е.Г.⁴, Батенева Е.И.¹

Экспериментальное исследование индукции гуморального ответа на синтетический мультимерный пептидный антиген, потенциально имитирующий конформационный эпитоп нейтрализации ВИЧ-1

¹ — ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 115478, Москва, Каширское ш., д. 24

² — ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18

³ — ФГБУ Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991, Москва, Ленинский просп., д. 47

⁴ — ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, Москва, Ломоносовский проспект, 2/62

Цель исследования — исследование возможности получения антител против линейного синтетического пептида, состоящего из повторов 3-аминокислотного эпитопа, потенциально имитирующего конформационный эпитоп нейтрализации ВИЧ-1 — NEQ (аспарагин, глутамин, глутамат). Наша авторская идея состояла в мультипликации такого 3-аминокислотного эпитопа в 15-аминокислотном линейном синтетическом пептиде (NEQ)₅. **Методика.** Пептид был синтезирован в компании Bioreptide Co. (USA). Степень очистки искомого продукта составляла 95%. Для создания иммуногенного препарата данный пептид ковалентно конъюгировали с высокомолекулярным пептидогликаном растительного происхождения ИммуномаксTM отечественного производства в качестве иммуoadъюванта. Сшивающим агентом служил реагент SMCC (сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат). Искомый продукт выделяли на колонке Zeba® Desalt Spin Columns. Полученным конъюгатом иммунизировали двухмесячных мышей-самок (СВА х С57Bl)F1. Иммунизацию производили трижды с интервалами в 30—45 сут. Все манипуляции с животными выполняли по стандартам SOP. Наличие антипептидных антител и их титр в сыворотках крови мышей оценивали методом ИФА. Оценивали также *in vivo* влияние внутрибрюшинного введения чистого адъюванта на транскрипцию информационной РНК первичного провоспалительного цитокина TNF в клетках перитонеального экссудата. Исследования проводили методом ПЦР в динамике, начиная с 30 мин до 48 ч после введения препарата. Взаимодействие полученных антипептидных антител с репликационно способным ВИЧ-1 оценивали в заражаемой культуре клеток MT4 по уровню вирусного белка p24 в супернатанте. Последний измеряли в указанные сроки методом ИФА в тест-системе «Вектор бест». **Результаты.** Пептид в чистом виде при введении *in vivo* мышам не индуцировал биосинтез антител в определяемых количествах. При иммунизации мышей конъюгатом пептида с ИммуномаксTM титры антипептидных антител составляли 10^{5–6}. ИммуномаксTM сам по себе при введении *in vivo* индуцировал транскрипцию иРНК TNF импульсно: в одном опыте в течении шестого часа, в другом — восьмого часа, без реактивации транскрипции в более поздние сроки. При добавлении антипептидной сыворотки в разведении 1/10 в культуру клеток MT4, инфицированных изолятом ВИЧ-1/ПВ, выявлена нейтрализация репликации вируса примерно на 90%. В больших разведениях эффект нейтрализации отсутствовал. Та же антипептидная сыворотка в отношении другого изолята ВИЧ-1/899 в культуре тех же клеток MT4 в разведении 1/20 усиливала репликацию вируса, что было воспроизведено в четырех повторных опытах. Реакции пептида с глутаматным рецептором мозга в ИФА тест-системе зарегистрировано не было. **Заключение.** Синтетический пептид — мультимер триплета (NEQ)₅, ковалентно конъюгированный с растительным пептидогликаном ИммуномаксTM в качестве адъюванта, индуцирует антительный ответ у мышей в титрах 10^{5–6}, по данным ИФА. Введение мышам чистого адъюванта в той же дозе индуцирует в клетках перитонеального экссудата импульсную транскрипцию иРНК первичного провоспалительного цитокина TNF в течение 6-го или 8-го часа после введения препарата. В культуре клеток MT4 антипептидная сыворотка в малых разведениях проявляла вирус-нейтрализующую активность в отношении изолята ВИЧ-1/ПВ, но усиливала репликацию в тех же клетках другого изолята ВИЧ-1/899. Такое расхождение результатов — нейтрализация вирусной инфекции или усиление инфекции — объясняет одну из трудностей при разработке анти-ВИЧ вакцин.

Ключевые слова: ВИЧ-1, синтетический пептидный антиген (NEQ)₅, иммуoadъювант ИммуномаксTM, ВИЧ-1/ПВ-нейтрализация, ВИЧ-1/899 усиление инфекции

Для корреспонденции: Игнатъева Галина Алексеевна, доктор мед. наук, проф., вед. науч. сотр. ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, e-mail: gaiti2007@mail.ru

Для цитирования: Игнатъева Галина Алексеевна¹, Корнилаева Галина Владимировна², Мельникова Татьяна Михайловна³, Сорокина Елена Геннадьевна⁴, Батенева Елена Ильинична. Экспериментальное исследование индук-

ции гуморального ответа на синтетический мультимерный пептидный антиген, потенциально имитирующий конформационный эпитоп нейтрализации ВИЧ-1. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60 (2): 24–28.

Финансирование: работа выполнена за счет средств государственного бюджета Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность: авторы благодарны руководству ФМБА России за поддержку исследовательской работы.

Поступила 28.01.16

Ignateva G.A.¹, Kornilaeva G.V.², Melnikova T.M.³, Sorokina E.G.⁴, Bateneva E.I.¹

Experimental study of antibody's response on synthetic multimeric peptide wich potentially imitate conformational neutralizing epitope of HIV-1

¹ — State research center «Institute of Immunology», Federal medical and biological agency of Russia, Moscow, Kashirskoe shosse, 24

² — State research N.F. Gamalea' center of epidemiology and microbiology, Moscow, Gamalea Str, 18

³ — State N.D. Zelinsky' Institute of organic chemistry of Russian academy of sciences, Leninsky prospect, 47

⁴ — State «Research center of children' health» Ministry of public health of Russia, Moscow, Lomonosov' prospect, 2

The purpose: We elaborate original synthetic peptide (NEQ)₅ wich is linear multiplication up to 15 amino acids of conformational neutralizing epitope of HIV-1 N, E, Q (asparagine, glutamate, glutamine) and investigate its immunogenicity and biological properties. **Methods.** Peptide was synthesized in Biopeptete Co. (US) with purity nearly 95%. This peptide was covalently bound with plant peptidoglycan Immunomax™ by SMCC (succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat). Conjugate was purified on Zeba® Desalt Spin Columns. Female mice (CBA x C57BL)F1, 2 month old in the beginning of experiments was immunized intraperitoneally 3 times with intervals of 30—45 days. All manipulation with animals was done according SOP. By real-time PCR we measured transcription of TNF mRNA in peritoneal exudates cells since 0, 5 h to 48 h after injection pure adjuvant. Interaction of this synthetic peptide with brain glutamate receptor was investigated in NR₂-GoldDot ELISA test system (US). Interaction of anti-peptide antibodies with replicating HIV-1 was investigated in MT4 cell culture by measuring p24 in culture supernatants. **Results.** Pure peptide don't induce detectable antibodies production, but conjugate «peptide-Immunomax™» induced anti-peptide antibodies production in ELISA titres 10^{5–6}. Pure adjuvant induced transcription of TNF mRNA in peritoneal cells only impulsive at 6 or 8 h after i.p. injection. Peptide (NEQ)₅ don't react with brain glutamate receptor in ELISA system NR₂-GoldDot. Anti-peptide serum in 1/10 dilution inhibite HIV-1/IIIB replication on nearly 90%. But the same sera in the dilution 1/20 enchanced replication of other isolate of HIV-1/899 in the same cells MT4. **Conclusion.** Multiepitopic synthetic peptide (NEQ)₅ can induce antibodies production if would be conjugated with adjuvant for example Immunomax™. This adjuvant *per se* induce transcription of primary proinflammatory cytokine TNF mRNA only impulsive at 6 or 8 h after *in vivo* injection. Anti-peptide antiserum inhibit replication of one isolate of HIV-1/IIIB, but enhance replication of other isolate HIV-1/899 in the same cells MT4. Such dilemma is one of the troubles in vaccine elaboration.

Keywords: Synthetic multimeric peptide (NEQ)₅; HIV1/IIIB neutralization; HIV-1/899 enchancement; immunoadjuvant Immunomax™

For citation: Ignateva G.A.¹, Kornilaeva G.V.², Melnikova T.M.³, Sorokina E.G.⁴, Bateneva E.I.¹ Experimental study of antibody's response on synthetic multimeric peptide wich potentially imitate conformational neutralizing epitope of HIV-1. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 24–28. (in Russ).

For correspondence: Galina A. Ignateva, professor, doctor of medical science, 115478 Moscow, Kashirskoye shosse, 24, Russian Federation, e-mail: gaiti2007@mail.ru

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: federal funding by Federal medical and biological agency of Russian Federation

Received 28.01.16

Введение

Как следует из анализа истории развития технологий производства вакцинных препаратов [1—4], на сегодня единственной методологией, не содержащей рисков присутствия в препаратах технологических примесных микробных патогенов, является химический синтез отдельных протективных эпитопов микроорганизмов-возбудителей заболеваний. Эпитопы — пептиды и их производные, как правило это низкомолекулярные вещества, не вызывающие *per se* иммунный ответ на себя при введении в организм животных. Чтобы получить иммунный ответ на них, необходимы иммуноадьюванты [5, 6].

Целью исследования было решение нескольких задач:

- разработка состава синтетического пептидного антигена,
- получение его конъюгата с адьювантом и получение гуморального иммунного ответа на синтетический антиген,
- исследование эффектов чистого адьюванта *in vivo* на транскрипцию информационной РНК провоспалительного цитокина TNF — фактора некроза опухолей.

Методика

Разработка состава

*синтетического пептидного антигена,
синтез ковалентного конъюгата с адьювантом*

В литературе описан трехаминокислотный конформационный эпитоп (аспарагин, глутамат, глутамин — N-E-Q), который связывают нейтрализующие антитела из крови ВИЧ-инфицированных пациентов [7]. Наша авторская идея состояла в том, чтобы синтезировать линейный пептид из повторов NEQ, в расчете на то, что в таком мультимере может реализоваться некая вероятность воспроизведения *in vivo* при иммунизации животных конформационного эпитопа нейтрализации. По нашему заказу в Bioreptide Co., Inc. (USA) был синтезирован мультимерный пептид с 5-кратно повторяющимся эпитопом NEQ. Степень чистоты пептидного препарата, по данным жидкостной хроматографии, составила 95%, молекулярная масса — 1857 Да.

В качестве адьюванта использовали препарат Иммуномакс™ — высокомолекулярный пептидогликан из растительного сырья. Синтез пептида с адьювантом выполняли с применением сшивающего агента SMCC — сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат — по стандартизованной методике. Реакцию проводили в фосфатном солевом буфере с pH 7, 2 с 1—5 mM EDTA и концентрацией сшивающего агента 0,436 мг/мл. Время

реакции 30 мин при комнатной температуре. Искомый продукт синтеза отделяли от непрореагировавших составляющих на колонке Zeba™ Desalt Spin Columns (US, Pierce, Rockford, IL).

Исследование эффектов введения in vivo чистого адьюванта на динамику экспрессии гена первичного провоспалительного цитокина TNF

Биологические свойства синтетического пептида, адьюванта и их конъюгата исследовали на двухмесячных мышках-самках (CBA x C57Bl)F1. Все манипуляции с животными проводили по международным стандартам операционных процедур (СОП, SOP): животные при этом клинически выглядели здоровыми, локомоторно подвижными, принимали корм и воду в нормальном режиме.

Биологическое воздействие адьювантов на организм животных оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) по маркерному признаку доиммунного воспаления — экспрессии информационной РНК гена фактора некроза опухолей. Опыты проводили в реальном времени в динамике на протяжении 48 ч от момента введения в организм препарата. Животным вводили внутривентриально 10 мкг препарата пептидогликана. Клетки брали из брюшной полости мышей («места введения» препарата) через 30 мин после инъекции, и далее каждые 30 мин в течение первых 2 ч, затем 1 раз в час до 8-го часа, и, наконец, через каждые 2 ч до 48-го ч после введения в организм препарата адьюванта. На каждую экспериментальную «точку» брали 2 животных. Из взятых суспензий клеток брали аликвоту, содержащую 2×10^6 ядродержащих клеток, выделяли из клеток РНК и ставили ПЦР в реальном времени с праймерами на TNF.

Иммунизация экспериментальных животных

Мышей иммунизировали внутривентриально, трижды с интервалом между процедурами иммунизации 50—60 сут. Дозы по пептиду составляли 10 и 100 мкг на мыш. В каждой группе было по 10 животных, каждый опыт повторяли трижды. При иммунизации конъюгатом пептида с пептидогликаном доза препарата на мыш составляла 10 мкг по пептидогликану. Антисыворотки для определения содержания антипептидных антител брали на 10-е — 12-е сут. после последней иммунизации. Наличие и титры антител определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Титрование антисывороток методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА)

Сыворотки титровали в твердофазном ИФА с сорбированными на твердой фазе пептидами из раствора в фосфатном солевом буфере с концентрацией

пептида 10 мкг/мл и с использованием высокочувствительного варианта детекции с субстратом тетраметилбензидином. Сыворотки титровали, начиная с разведения 1:10 и до 10^7 с шагом 1:10, каждое разведение сыворотки закапывали в 2 лунки планшета для ИФА.

Исследование возможной реактивности данного синтетического пептида с глутаматными рецепторами мозга

Растворы пептида с концентрациями 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, 100 мкг/мл вносили в сыворотку положительного контроля, то есть использовали в качестве конкурентного реагента в тест-системе Gold Dot (USA), предназначенной для выявления антител к NR₂-субъединице глутаматного рецептора (NMDA)RcGlu мозга человека. После инкубации с конкурирующими пептидами анализ проводили по протоколу тест-системы.

Исследование вирус-нейтрализующей активности антипептидных сывороток в культуре клеток in vitro

Исследование выполнено в сертифицированной для работы с ретровирусами лаборатории Института вирусологии им Д.И. Ивановского.

В качестве культивируемых клеток использовали линию МТ4, в качестве вируса иммунодефицита — 2 лабораторных штамма ВИЧ-1/ШВ и ВИЧ-1/899. Заражающая доза вируса ВИЧ-1/ШВ составляла 10 TCID₅₀ (tissue culture infectious dose — 50%). В качестве положительного контроля использовали высокотитражную сыворотку ВИЧ-1-инфицированного человека, в качестве отрицательного контроля — сыворотку интактных мышей (пул от 10 животных). Сыворотки разводили 1/10; 1/20; 1/40; 1/80; 1/160. При работе с новым штаммом ВИЧ-1/899 исследовали ряд разведений вируса от 5^1 до 5^8 с шагом в показателе степени «1» и одно разведение антисыворотки 1/20. Количественным показателем интенсивности репликации вируса служила концентрация вирусного белка р24 в супернатанте культур клеток: чем выше уровень р24 — тем больше репликация вируса. Р24 измеряли методом ловушечного ИФА в тест-системе «Вектор бест» (Новосибирск).

Результаты и обсуждение

Исследование экспрессии иРНК TNF в клетках перитонеального экссудата в течение 48 часов после введения Иммуномакса™

Результаты показали, что на протяжении 6 часов после введения препарата-индуктора доиммунного воспаления транскрипция иРНК провоспалительного

цитокина TNF в измеряемых количествах не обнаружена, поскольку «сигнал» ПЦР в клетках мышей, которым ввели индуктор, не отличался от сигнала в клетках интактных контрольных мышей. Скачок сигнала ПЦР-РВ, отражающий возрастающее количество информационной РНК для биосинтеза TNF в клетках наблюдали при дозе пептидогликана 10 мкг на мышь в одном опыте в течение 6-го часа, во втором — 8-го часа после введения препарата. В обоих опытах импульсно, после чего количество иРНК резко снижалось и до 48 ч (срок наблюдения) реэкспрессии иРНК TNF не наблюдалось.

Титрование антисывороток

Результаты титрования антисывороток методом ИФА показали, что чистый 15-членный пептид без адьюванта не индуцирует антительный ответ ни в дозе 10 мкг, ни в дозе 100 мкг на мышь. Ковалентный конъюгат этого пептида с Иммуномаксом™ в дозе 10 мкг по адьюванту индуцирует антительный ответ после 3-й иммунизации в титрах 10^5 — 10^6 .

Исследование возможной реактивности синтетического пептида с глутаматными рецепторами мозга

Мы исследовали наш 15-членный пептидный антиген в качестве конкурента в коммерческой иммуноферментной тест-системе Gold Dot, предназначенной для выявления антител к глутаматным рецепторам мозга. Растворы пептида в конечных концентрациях 0,1 мкг/мл; 1 мкг/мл; 10 мкг/мл; 100 мкг/мл использовали в качестве конкурентного реагента, добавляя их к сыворотке положительного контроля за 30 мин и 12 ч до внесения проб в лунки тест-системы. Результаты показали, что наш пептид не конкурировал за связывание с антителами позитивного контроля к глутаматному рецептору мозга.

Исследование вирус-нейтрализующих свойств антипептидных сывороток

Антипептидная сыворотка в разведении 1/10 показала нейтрализацию репликации вируса штамма ВИЧ-1/ШВ примерно на 90%. В более высоких разведениях эффекта нейтрализации зарегистрировано не было.

В отношении штамма ВИЧ-1/899 эффект нейтрализации вирусной инфекции антисывороткой в разведении 1/20 отсутствовал, напротив, был зарегистрирован эффект усиления репликации вируса в присутствии антисыворотки.

Краткосрочный импульсный характер индукции экспрессии гена такого сильного провоспалительного цитокина как TNF после введения *in vivo* препарата адьюванта Иммуномакса™, по крайней мере, в тече-

ние двух суток, является благоприятным результатом, позволяющим предполагать невысокий риск генерализации доиммунного воспаления от введения *in vivo* адьюванта как такового. В перспективе было бы правильнее проводить скрининг потенциальных адьювантных препаратов, а за ними и вакцинных, по экспрессии не одного гена, а по крайней мере нескольких, и лучше исследовать полногеномный транскриптом в динамике, включая более отдаленные сроки наблюдения (неделя, месяц и т.д.). Это позволит объективно обосновывать био-безопасность потенциальных иммуногенных композиций для целей вакцинации людей.

Чистый пептид с мол. массой 1857 Да при введении животным *in vivo* в дозах 10 и 100 мкг на мышь не индуцировал продукцию противопептидных антител. Ковалентный конъюгат этого пептида с высокомолекулярным препаратом пептидогликана ИммуномаксTM позволяет получить антительный ответ до титров 10^{5-6} при детекции в ИФА.

Исследование возможной реактивности данного синтетического пептида с глутаматным рецептором мозга мы предприняли в связи с тем, что в данном пептиде 75% аминокислотного состава — это как раз глутамин и глутамат. В ткани мозга человека известны рецепторы к глутамату, антитела к которым имеют диагностическое и патогенетическое значение при травмах мозга и/или аутоиммунных воспалительных процессах в мозге. Поскольку для относительно низкомолекулярного пептида гематоэнцефалический барьер может быть проницаем, мы оценили возможность реакции нашего пептида хотя бы в ИФА тест-системе Gold Dot (USA), предназначенной для выявления антител к NR₂-субъединице глутаматного рецептора (NMDA)RcGlu мозга человека. В данном анализе заинтересованность нашего пептида не зарегистрирована. Эти данные позволяют надеяться, по крайней мере, что введение в организм млекопитающих данного пептидного антигена не затронет одну из рецепторных систем мозга — глутаматные рецепторы.

Исследование взаимодействия антипептидных антител с ВИЧ-1 в культуре клеток МТ4 показало рас-

ходящиеся результаты на двух разных изолятах ВИЧ-1. Антипептидная сыворотка в разведении 1/10 нейтрализовала активную репликацию изолята ВИЧ-1/ШВ, в больших разведениях эффект нейтрализации не проявлялся. Та же антипептидная сыворотка в разведении 1/20 усиливала репликацию другого изолята вируса ВИЧ-1/899 в тех же клетках МТ4. Интерпретировать такой результат можно по-разному. Во-первых, как артефакт, однако сходные результаты были получены в 4 постановках эксперимента. Во-вторых, возможно это действительно эффект усиления вирусной инфекции антителами и наш синтетический пептид на самом деле «угадал» вирусный эпитоп, но желаемый эффект нейтрализации инфекции антителами не распространяется на разные изоляты вируса. Эффект усиления вирусной инфекции противовирусными антителами, как раз на примере ВИЧ-1, мы впервые наблюдали в 1985 г. [8], поэтому и в данной работе совсем неожиданным такой результат для нас не стал.

References

1. Wen P., Ellis R., Pujar N.S. eds. *Vaccine Development and Manufacturing*. Hoboken, New Jersey: WILEY; 2015. 523 pp.
2. Miller N.Z. *Vaccines: are they really safe and effective*. Santa Fe, New Mexico: New Atlantean Press; 2015.
3. Largent M.A. *Vaccine*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 2012.
4. B.R. Bloom, P-H Lambert, eds. *The Vaccine Book*. San Diego, London: Academic Press; 2003, 436 pp.
5. S. Zolla-Pazner, T. Cadozo Structure-Function relationships of HIV-1 envelope sequence-variable regions refocus vaccine design. *Nat. rev. Immunology*. 2010; v. 10 (7): 527-35.
6. Ignateva G.A., Maksutov A.Z., Lvov V.L., Kolobov A.A. Experimental research the vaccines to fast modifying pathogens: multiepitope antigens and new adjuvants. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; (2): 2011; 3: 40-2. (in Russian)
7. Ignateva G.A., Ignatev T.I. Biological properties of immunoadjuvants: historical and modern knowleges. *Fiziologiya i patologiya o Immunnoy systemy*. 2010; 1: 15-21. (in Russian).
8. Ignateva G.A., Sidorovich I.G., Nesterchuk S.L., Barinsky I.F. Anti-HIV monoclonal antibodies can enhance the virus infection. *Doklady Akademii nauk SSSR*. 1989; 306 (5): 1272-5. (in Russian)

Сведения об авторах:

Корнилаева Галина Владимировна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. «Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, kornilaeva@yandex.ru

Мельникова Татьяна Михайловна, канд. хим. наук, науч. сотр. ФГБУ «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН», loboda1950@mail.ru

Сорокина Елена Геннадьевна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России, sorokelena@mail.ru

Батенева Елена Ильинична, науч. сотр. ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России