



УДК 578.112.083.3 : 578.224'24

© 1990 г.

Р. Ульрих, Г. Ш. Борисова\*, Р. Меринг,  
И. Лэтч, В. П. Осе\*\*, И. Г. Берзинь\*,  
Д. Э. Дрейлиня\*, П. М. Пушко\*, В. В. Цибиногин\*\*\*,  
П. П. Пулпен\*, Х. А. Розенталь, Э. Я. Грен\*

### ЭКСПОНИРОВАНИЕ ЭПИТОПОВ ТРАНСМЕМБРАННОГО БЕЛКА gp41 ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА НА ПОВЕРХНОСТИ КАПСИД КОР-АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В

Институт медицинской вирусологии, Отдел медицины Университета им. Гумбольдта  
(Шарите), Берлин, ГДР;

\* Отдел молекулярной биологии Института органического синтеза АН Латвии, Рига;

\*\* Институт микробиологии им. А. Кирхенштейна АН Латвии, Рига;

\*\*\* Экспериментальный завод Института органического синтеза, Рига

Возможность экспонирования, чужеродных эпитопов на поверхности кор-антигена (НВсAg) вируса гепатита В (HBV) [1, 2] открывает перспективы для конструирования широкого спектра химерных капсид с заданными иммунологическими свойствами. Такое экспонирование достигается в результате внедрения фрагментов ДНК, кодирующих аминокислотные последовательности эпитопов, по специально выбранным участкам гена НВсAg, например по кодону Pro<sup>144</sup> [3]. Этот участок находится непосредственно у места процессинга, приводящего к образованию е-антигена (НВеAg) — в результате отщепления С-концевого полиаргининового тракта НВсAg [4].

Химерные капсиды на основе НВсAg могут быть использованы в первую очередь как компоненты диагностикумов и вакцин. Последнее тем более перспективно, что НВсAg при иммунизации не только обеспечивает высокий уровень образования опосредованных В-клеточным иммунитетом антител, но и обладает ярко выраженным свойством стимулировать Т-клеточный иммунный ответ как на собственные последовательности [5, 6], так и на сопутствующие эпитопы [7]. Способность же к одновременной индукции В- и Т-зависимого иммунного ответа выдвигается в настоящее время в качестве основного требования при создании рекомбинантных вакцин [8].

В качестве источника эпитопов для экспонирования мы выбрали трансмембранный белок gp41 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) [9], являющегося одним из этиологических агентов синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД). Указанный белок кодируется геном *env* ВИЧ-1 и образуется в результате процессинга длинного предшественника gp160 с образованием gp41 и наружного оболочечного белка gp120 [10]. Белок gp41 обладает иммунодоминантными эпитопами вируса. Так, анти-gp41-антитела обнаруживаются у всех больных и вирусоносителей [11], что делает их важнейшим диагностическим маркером для выявления ВИЧ-носительства. Более того, обнаружены антитела к продуктам гена *env*, которые обладают вируснейтрализующей активностью [12].

В качестве «вектора экспонирования» мы использовали плазмиду pНВс1315, несущую ген кор-антигена с полилинкерным участком *EcoRV-ClaI-PvuI*, внедренным по сайту *MspI*, который перекрывает кодон Pro<sup>144</sup>. Полилинкер кодирует вставку из 12 аминокислот (KRSISKRSISIS) между 144-м и 145-м аминокислотными остатками НВсAg (рис. 1). По сайту

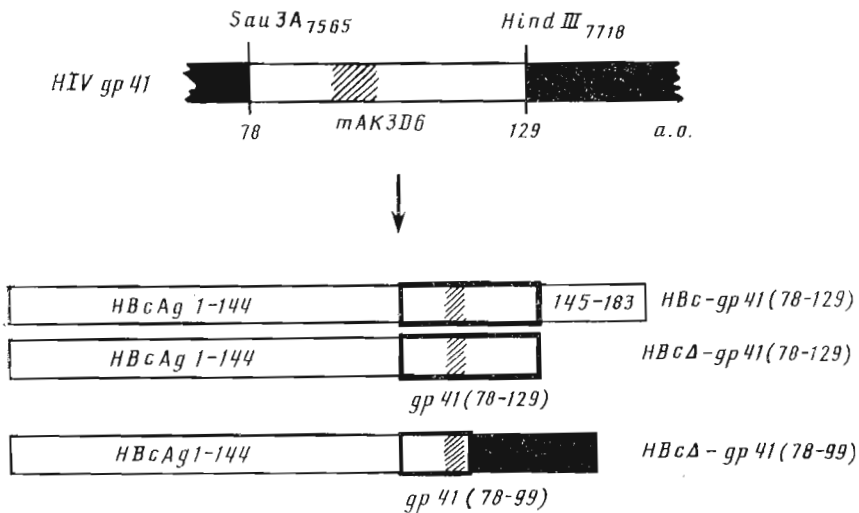


Рис. 1. Принципиальная схема конструирования химер, несущих эпитопы трансмембранного белка gp41 ВИЧ-1 (gp41 HIV-1) на поверхности кор-антигена вируса гепатита В. Заштрихован участок gp41, распознаваемый моноклональными антителами mAK 3D6. В химерных конструкциях утолщенной линией выделены внедренные эпитопы, закраснен участок, соответствующий району случайной рамки считывания

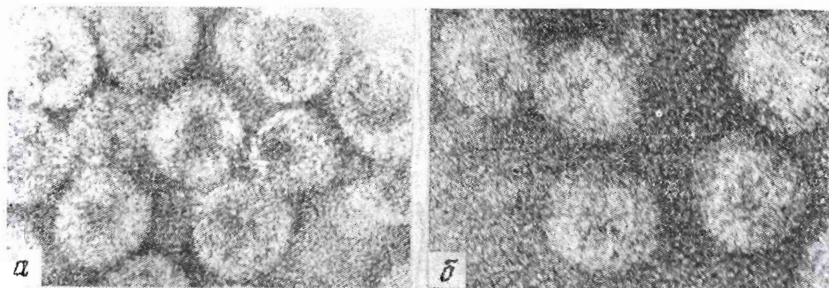


Рис. 2. Электронная микрофотография химерных капсид на основе кор-антигена: а — контроль (исходный HBcAg); б — HBc-gp41 (78—129). Увеличение 520 000 раз

*Cla*I полилинкера клонировали фрагмент гена *env* ВИЧ-1 между сайтами рестрикции *Sau*3A<sub>7565</sub> и *Hind*III<sub>7718</sub> [9], кодирующий иммунодоминантный участок белка gp41 с 78-го по 129-й аминокислотный остаток (или с 596-го по 647-й аминокислотный остаток полного продукта гена *env* — gp160) [13, 14].

На рис. 1 приведена принципиальная схема конструирования химерных белков, несущих участок gp41 ВИЧ-1. В первую очередь, были сконструированы два варианта структур, включающих в себя 52 аминокислоты белка gp41 — с сохранением С-концевого полиаргининового тракта HBcAg и без него. Затем в результате делеции *Sty*I-фрагмента (от *Sty*I<sub>7626</sub> из генома ВИЧ-1 до *Sty*I в векторе) был получен вариант, содержащий укороченный участок gp41 — с 78-й по 99-ю аминокислоту, но удлиненный на 47 аминокислот за счет считывания случайной последовательности вектора до первого терминирующего кодона.

По результатам иммуноблоттинга, в клетках *E. coli*, несущих соответствующие плазмиды, образуются полипептиды ожидаемой по конструированию длины, которые распознаются не только анти-HBc, но и моноклональными антителами mAK 3D6, узнающими эпитоп, расположенный между 80-м и 110-м аминокислотными остатками в последовательности белка gp41.

Химерные белки обладают полноценной кор-антигенной активностью, о чем свидетельствуют результаты двойной радиальной иммунодиффузии по Охтерлони против анти-HBc человека. Линии иммунопреципитации,

образуемые химерными белками, полностью сливаются с таковыми, образованными контрольным НВсAg.

По результатам электронной микроскопии, химерные белки образуют капсиды с диаметром 25—27 нм, близкие по размерам и морфологии к исходному НВсAg (рис. 2). Правда, химерные капсиды в отличие от исходных более диффузны и отличаются некоторой нерегулярностью. Для дальнейшего изучения химерные капсиды очищали фракционированием на колонке с сефарозой CL4B.

Твердофазный иммуноферментный анализ химер показал, что введенный эпитоп gr41 в самом деле расположен на поверхности капсиды: нативные химеры, сорбированные на твердой фазе, обладают не только НВс-, но и gr41-активностью.

По предварительным данным, химерные капсиды обладают не только антигенными свойствами gr41, но и характерной для него иммуногенностью — по результатам иммунизации кроликов.

Авторы глубоко признательны сотрудникам Института органического синтеза д-ру А. В. Дишлеру и Ю. А. Озолсу за помощь в работе, д-ру Э. И. Станкевич и руководимой ею группе за предоставление синтетических олигонуклеотидов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Borisova G., Bundule M., Grinstein E., Dreilina D., Dreimane A., Kalis J., Kozlovskaya T., Loseva V., Ose V., Pumpen P., Pushko P., Snikere D., Stankevica E., Tsinbinogin V., Gren E. J. // *Mol. Gen. (Life Sci. Adv.)*. 1987. V. 6. P. 169—174.
2. Борисова Г. П., Калис Я. В., Пушко П. М., Цибиногин В. В., Лосева В. Я., Осе В. П., Станкевич Э. И., Дреймане А. Я., Сникере Д. Я., Гринштейн Э. Э., Пушлен П. П., Грен Э. Я. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 298. № 6. С. 1474—1478.
3. Борисова Г. П., Берзинь И. Г., Осе В. П., Цибиногин В. В., Лосева В. Я., Пушко П. М., Дрейлина Д. Э., Пушлен П. П., Грен Э. Я. // Докл. АН СССР. 1990. Т. 342. № 3.
4. Takizashi K., Machida A., Funatsu G., Nomura M., Usuda A., Aoyagi S., Tachibana K., Miyamoto H., Imai M., Nakamura T., Miyakawa Y., Mayumi M. // *J. Immunol.* 1983. V. 130. № 6. P. 2903—2907.
5. Milich D. R., McLachlan A. // *Science*. 1986. V. 234. P. 1398—1401.
6. Milich D. R., McLachlan A., Moriarty A., Thornton G. B. // *J. Immunol.* 1987. V. 139. № 4. P. 1223—1231.
7. Milich D. R., McLachlan A., Hughes J. L., Jones J. E., Stahl S., Wingfield P., Thornton G. B. // *Vaccines 1989*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. P. 37—42.
8. Coates A. R. M., Cookson J., Barton G. J., Zvelebil M., Sternberg M. J. E. // *Nature*. 1987. V. 326. № 6113. P. 549—550.
9. Ratner L., Haseltine W., Patarca R., Livak K. J., Starcich B., Josephs S. F., Doran E. R., Rafalski J. A., Whitehorn E. A., Baumeister K., Ivanoff L., Pelteway, Jr., S. R., Pearson M. L., Lautenberger J. A., Papas T. S., Ghayeb J., Chang N. T., Gallo R. C., Wong-Staal F. // *Nature*. 1985. V. 313. № 6000. P. 277—284.
10. Kowalski M., Potz J., Basiripour L., Dorfman T., Goh W. C., Terwilliger E., Dayton A., Rosen C., Haseltine W., Sodroski J. // *Science*. 1987. V. 287. P. 1351—1355.
11. Windheuser M. G., Wood C. // *Gene*. 1988. V. 64. № 1. P. 107—119.
12. Ho D. D., Sarngadharan M. G., Hirsh M. S., Schooley R. T., Rota T. R., Kennedy R. C., Chank T. C., Sato V. L. // *J. Virol.* 1987. V. 61. № 1. P. 2024—2028.
13. Gnann J. W., Nelson J. A., Oldstone M. B. A. // *J. Virol.* 1987. V. 61. № 8. P. 2639—2641.
14. Modrow S., Hahn B. H., Shaw G. M., Gallo R. C., Wong-Staal F., Wolf H. // *J. Virol.* 1987. V. 61. № 2. P. 570—578.
15. Grunow R., Jahn S., Porstmann T., Kießig S., Steinkellner H., Steindl S., Matanovich D., Gurtler L., Deinhardt F., Katinger H., von Baehr R. // *J. Immunol. Methods*. 1988. V. 106. № 2. P. 257—265.

Поступило в редакцию  
1.11.1990

R. ULRICH, G. P. BORISOVA \*, R. MÖHRING, I. LÄTZSCH,  
V. P. OSE \*\*, I. G. BERZINS \*, D. E. DREILINA \*, P. M. PUSHKO \*,  
V. V. TSIBINOĞIN \*\*\*, P. P. PUMPEN \*, H. A. ROSENTHAL, E. J. GREN \*

EXPOSURE OF HIV-1 gp41 TRANSMEMBRANE PROTEIN EPITOPES  
ON THE SURFACE OF HEPATITIS B CORE ANTIGEN CAPSIDS

*Institut für medizinische Virologie, Bereich Medizin der Humboldt-Universität (Charité),  
Berlin, DDR;*

*\* Department of Molecular Biology, Institute of Organic Synthesis, Latvian Academy  
of Sciences, Riga;*

*\*\* A. Kirhenstein Institute of Microbiology, Latvian Academy of Sciences, Riga;*

*\*\*\* Experimental Plant, Institute of Organic Synthesis, Riga*

Insertion of 52 amino acid sequence of transmembrane protein gp41 of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1), (amino acid residues 78 to 129 of gp41 or 596 to 647 of Env), at the Pro<sup>144</sup> position of the hepatitis B core antigen (HBcAg) leads to the formation of chimeric capsids which retain morphology of intact HBcAg but expose on their outer surface major HIV-1 epitopes localised in the inserted gp41 fragment. Antigenicity of inserted gp41 epitopes within chimeric capsids remains undisturbed. The localization of gp41 epitopes on the capsids does not depend on the presence or absence of the arginine-rich 39 amino acid C-terminus of HBcAg.