

НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ НАНОКОМПЛЕКСОВ ПУТЕМ НЕКОВАЛЕНТНОЙ КОНЬЮГАЦИИ БЕЛКОВ С ВИРУСНЫМИ ЧАСТИЦАМИ

© 2011 г. А. А. Ярославов*, И. Б. Каплан*[#], Т. Н. Ерохина**, С. Ю. Морозов*,
А. Г. Соловьев*, А. Д. Лещинер*, А. А. Рахнянская*, А. С. Малинин*,
Л. А. Степанова***, О. И. Киселев***, И. Г. Атабеков*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, ГСП-1,
Ленинские горы;

**Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. акад.
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

***Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский
институт гриппа» МЗ и СР РФ, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 25.10.2010 г. Принята к печати 23.12.2010 г.

Предложен новый метод нековалентной иммобилизации пептидного эпитопа на поверхности вириона для упрощения и стандартизации процедуры получения вирусных наноконструкций. Эффективность подхода показана на примере модельной системы, включающей вирус табачной мозаики, синтетический катионный полимер, поли-*N*-этил-4-винилпиридинийбромид, и модельный полипептид. Принцип последовательной адсорбции, лежащий в основе получения тройной системы вирион–поликатион–белок, был использован нами для электростатической иммобилизации на поверхности вириона рекомбинантного гидрофильного фрагмента гемагглютинаина вируса гриппа (Flu1-3). В результате достигнуто заметное увеличение иммуногенной активности потенциального искусственного вакцинного белка.

Ключевые слова: наноконструкции; вирусные частицы, конъюгация с белками; поликатион; гемагглютинин; иммунизация.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время одним из активно развивающихся направлений нанобиотехнологии стала наномедицина, предполагающая получение и использование наноконтейнеров, нановакцин и наноразмерных диагностических комплексов. Один из подходов к созданию нанобиочастиц заключается в формировании биологически активных (узнающих) центров на поверхности вирусов растений или бактерий [1–8]. Генно-инженерные методы позволяют экспонировать на поверхности вирионов короткие антигенные пептиды (эпитопы) вирусной или бактериальной природы. Модифицированные таким образом вирионы, часто называемые химерными вирусами, несут большое количество копий эпитопа, что приводит к многократному усилению его иммуногенности.

Сокращения: АС – антисыворотка; БСА – бычий сывороточный альбумин; ВТМ – вирус табачной мозаики; ГА – гемагглютинин; ИФА – иммуноферментный анализ; ПААГ – полиакриламидный гель; ПЭВП – поли-*N*-этил-4-винилпиридинийбромид; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ЭФП – электрофоретическая подвижность; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; Flu1-3 – рекомбинантный фрагмент гемагглютинаина вируса гриппа; PBS – фосфатно-солевой буфер, pH 7.4 (1.44 г/л Na₂HPO₄, 0.24 г/л KH₂PO₄, 0.2 г/л KCl, 8.0 г/л NaCl).

[#]Автор для связи (тел.: (495) 939-33-47; факс: (495) 939-31-81; эл. почта: igor_b_kaplan@yahoo.com).

Использование химерных вирусов позволяет: а) достичь исключительно высокого уровня иммуногенности презентуемого на его поверхности эпитопа, б) накапливать вакцинный материал в зараженном растении и в) использовать традиционные процедуры для их выделения и очистки [1, 8–18]. В то же время замена нативных капсидных белков на рекомбинантные с дополнительными фрагментами в полипептидной цепи во многих случаях приводит к весьма низкой эффективности накопления вирионов [11–13].

Другой способ получения химерных вирусов заключается в химической модификации исходных вирусных частиц выбранными белками (например, рекомбинантными белками-антигенами) с помощью бифункциональных сшивающих агентов [5, 19–21] либо через формирование специфического контакта авидин-биотин [12, 22].

Мы предлагаем для упрощения и стандартизации процедуры получения химерных вирусных частиц использовать нековалентную иммобилизацию пептидного эпитопа на поверхности вириона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве носителя эпитопов были использованы частицы ВТМ. Известно, что в растворах с рН, близким к нейтральному, частицы ВТМ заряжены отрицательно; поэтому мы ожидали, что в этих условиях поверхность вириона будет эффективно адсорбировать положительно заряженные полиионы (поликатионы). В условиях избытка катионного полимера это должно привести к перезарядке поверхности, которая после такой модификации сможет адсорбировать отрицательно заряженные синтетические полипептиды или нативные белки.

Мы демонстрируем эффективность этого подхода на примере модельной системы, включающей ВТМ, синтетический катионный полимер поли-*N*-этил-4-винилпиридинийбромид (ПЭВП) и слабоанионный белок БСА. Известно, что изоэлектрическая точка (pI) белка оболочки ВТМ равна 3.5; для БСА эта величина составляет 4.6–4.8. С учетом этого, эксперименты по конструированию тройной системы ВТМ–ПЭВП–БСА проводили при рН 7.5, когда вирусные частицы и молекулы белка были заряжены отрицательно; макромолекулы ПЭВП в этих условиях несли положительный заряд.

За формированием комплекса ВТМ–ПЭВП следили по изменению электрофоретической подвижности (ЭФП) вирусных частиц, используя метод лазерного микроэлектрофореза (рис. 1). Видно, что увеличение концентрации ПЭВП в системе сопровождалось нейтрализацией заряда частиц; при высоких концентрациях поликатиона

поверхность частиц приобретала положительный заряд. Эти результаты однозначно указывали на связывание макромолекул ПЭВП с поверхностью частиц вириона.

Для оценки количества макромолекул, способных связаться с одной частицей ВТМ (емкость вириона по поликатиону, N), использовали следующую процедуру. Вначале спектрофотометрически была получена калибровочная зависимость оптического поглощения раствора ПЭВП ($\lambda = 256$ нм) от его концентрации. Затем раствор полимера известной концентрации добавляли к суспензии ВТМ, через 20 мин образовавшийся комплекс отделяли центрифугированием и определяли концентрацию полимера в надосадочной жидкости с использованием калибровочной кривой (рис. 2). Из рисунка видно, что поликатион отсутствовал в супернатанте вплоть до $[\text{ПЭВП}]_{\text{max}} = 1.23 \times 10^{-4}$ М. При этой концентрации достигалось предельное заполнение поверхности вириона поликатионом, после чего адсорбция прекращалась.

Полученные данные позволили рассчитать емкость вириона по поликатиону: $N_{\text{ПЭВП}} = [\text{ПЭВП}]_{\text{max}} / [\text{ВТМ}] \times 600 \approx 24$ моль ПЭВП (где 600 – число молей поли-4-винилпиридина). Принимая во внимание, что каждая вирусная частица состоит из 2130 идентичных белковых молекул (белковых субъединиц), каждая адсорбированная макромолекула оказывается связанной с $2130 / N_{\text{ПЭВП}} \approx 90$ молекулами белка оболочки вируса.

Формирование тройного комплекса ВТМ–ПЭВП–белок контролировали с помощью метода флуоресценции. С этой целью был приготовлен БСА, ковалентно меченный FITC (см. «Эксперимент. часть»), который добавляли к комплексу ВТМ–ПЭВП с максимальным содержанием поликатиона. Концентрация вириона была равна 0.3 мг/мл, что соответствовало 8.3×10^{-9} М частиц ВТМ (рассчитано исходя из молекулярной массы частицы ВТМ). В дальнейшем следовали процедуре, описанной выше для анализа комплексообразования в системе ВТМ + ПЭВП, однако концентрацию белка в надосадочной жидкости определяли по интенсивности флуоресценции метки (FITC), сравнивая флуоресценцию супернатанта с калибровочной кривой в отсутствие бинарного комплекса ВТМ–ПЭВП. Оказалось, что белок не регистрировался в супернатанте вплоть до $[\text{БСА}]_{\text{max}} = 2 \times 10^{-6}$ М, которая соответствовала предельному заполнению поверхности бинарного комплекса белковыми глобулами. Полученная зависимость позволила рассчитать емкость бинарного комплекса по белку $Q_{\text{БСА}} = [\text{БСА}]_{\text{max}} / [\text{ВТМ}] = 240$ моль БСА на 1 частицу вириона ($2 \times 10^{-6} / 8.3 \times 10^{-9}$).

Максимальное количество глобул БСА, которое формирует монослой на поверхности частиц вириона, $Q_{\text{БСА, моно}}$, можно оценить следующим образом. Суммарная площадь поверхности частицы, S , равна $L \times \pi d + \pi d^2/4$, где L и d – длина частицы вириона и ее

диаметр соответственно. Принимая $L = 300$ нм и $d = 17$ нм, получаем $S = 16100$ нм². Диаметр глобулы БСА равен 5.6 нм. В простейшем случае площадь, занимаемая одной адсорбированной глобулой, может быть рассчитана как $S_{\text{БСА}} = (5.6 \text{ нм})^2 = 31.3$ нм². Это означает, что количество глобул БСА, формирующих плотный монослой на поверхности частицы вириона, равно $Q_{\text{БСА, моно}} = 16100 \text{ нм}^2 / 31.3 \text{ нм}^2 = 520$. Таким образом, достижимая в эксперименте доля заполнения поверхности комплекса вирион-ПЭВП молекулами белка составляет $Q_{\text{БСА}} / Q_{\text{БСА, моно}} = 240 / 520 \times 100\% = 46\%$. Для оценки морфологии бинарных комплексов ВТМ-ПЭВП и тройных комплексов ВТМ-ПЭВП-БСА был использован метод просвечивающей электронной микроскопии (рис. 3). Видно, что адсорбция ПЭВП на поверхности частиц вириона сопровождалась агрегацией комплексов ПЭВП-ВТМ. Модифицированные поликатионом частицы вириона объединялись своими боковыми сторонами, формируя протяженные структуры («снопы») толщиной до 150 нм (рис. 3а). Добавление раствора БСА к суспензии комплекса ВТМ-ПЭВП приводило к разрушению агрегатов и появлению частиц, линейные размеры которых были близки к размерам немодифицированного вириона см. выше), но часто имели больший диаметр частиц (рис. 3б). Очевидно, дезагрегация была следствием образования тройного комплекса ВТМ-ПЭВП-БСА.

Таким образом, мы показали, что тройной комплекс ВТМ-ПЭВП-БСА мог быть сформирован путем последовательной электростатической адсорбции катионного полимера и слабоанионного белка на поверхности частиц вириона. Схематически эта процедура изображена на рис. 4.

Принцип последовательной адсорбции, лежащий в основе получения тройной системы вирион-поликатион-белок, был затем использован нами для электростатической иммобилизации на поверхности вириона рекомбинантного гидрофильного фрагмента гемагглютинаина вируса гриппа (Flu1-3).

Молекула гемагглютинаина (ГА) содержит два протяженных трансмембранных домена. Наличие этих доменов в экспрессируемой ДНК не позволяет получать эффективной бактериальной продукции полноразмерного ГА (наши неопубликованные данные). В последовательности, кодирующей фрагмент гемагглютинаина Flu1-3 и использованной нами для получения синтетического гена, эти домены отсутствовали. Для создания гена вакцинного мультиэпитопного белка Flu1-3 был выбран район гемагглютинаина типа H5 штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1), расположенный между областями, обогащенными пролиновыми остатками, и соответствующий кодонам участка 65–174 геномной РНК (GenBank accession DQ449640).

Синтез фрагмента кДНК гена гемагглютинаина H5 проведен с использованием обратной транскрипции с последующей ПЦР (RT-PCR) с помощью специфических затравок на суммарной РНК штамма вируса гриппа A/Kurgan/5/05 (H5N1), полученной из коллекции вирусов ГУ НИИ гриппа РАМН.

Этот фрагмент был клонирован в экспрессионный вектор pQE30 (Qiagen). В результате была получена плазида pQE-HA1-3, обеспечивающая под контролем индуцируемого промотора синтез целевого фрагмента гемагглютинаина Flu1-3 с N-концевой олигогистидиновой последовательностью и C-концевым глицилсериновым линкером (рис. 5). Этот белок был очищен с помощью Ni-содержащей аффинной колонки (Qiagen).

Путем иммунизации лабораторных животных (мышей) сделана оценка иммуногенной активности полученного наноконструкта ВТМ-ПЭВП-Flu1-3. Мы сравнили титры антител в антисыворотках, полученных при иммунизации двух групп мышей фрагментом вируса гриппа Flu1-3 или тройным комплексом ВТМ-ПЭВП-Flu1-3 (рис. 6). Из рисунка видно, что иммунизация тройным комплексом вызывает значительное усиление иммунного ответа (кривая 1), что выражается в значительном увеличении титра антисыворотки к тройному комплексу по сравнению с титром антисыворотки к Flu1-3 (кривая 2). Реакция сыворотки неиммунных мышей при этом находится на уровне фоновых значений (кривая 3).

Таким образом очевидно, что предложенный метод формирования иммуноактивных наноконструктов действительно способствует значительному усилению иммунного ответа на представленный антиген и может быть использован при создании эффективных многокомпонентных генно-инженерных вакцин нового поколения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали БСА и БСА-FITC (Serva), акриламид и бисакриламид (BioRad). Вирус гриппа штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) получен из музея вирусов ФБГУ «НИИ гриппа» Минздравсоцразвития.

Воду для приготовления растворов очищали двойной перегонкой с последующим пропусканием через систему Milli-Q (Millipore), включающую ионообменные и адсорбционные колонки для глубокой очистки от органических примесей и фильтр для удаления крупных частиц. Очищенная таким образом вода имела удельную электропроводность 0.056 мкСм/см.

Накопление ВТМ и получение очищенных вирусных препаратов. ВТМ размножали в растениях *Nicotiana tabacum* var. Samsun. Растения выдерживали при 24°C и выделяли вирус спустя 3–4 недели после инокуляции. Замороженные листья

гомогенизировали в мясорубке и отжимали сок через марлю. К полученному гомогенату добавляли двойной объем 20 мМ фосфатного буфера (pH 7.0). Далее центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин в центрифуге Beckman J2-21 (Beckman) для осаждения клеточного дебриса, а затем супернатант встряхивали со смесью хлороформ–бутанол (1 : 1), взятой в объеме, равном 1/8 от объема препарата. Водную фазу отделяли низкоскоростным центрифугированием и осаждали из нее вирус добавлением полиэтиленгликоля-6000 до концентрации 4% и хлорида натрия до концентрации 0.5 М. Осадок, содержащий вирус, собирали центрифугированием при 10000 об/мин и ресуспендировали в 20 мМ фосфатного буфера (pH 7.0). Из полученной суспензии вирус осаждали ультрацентрифугированием в течение 90 мин при 30000 об/мин в центрифуге Beckman L5-50 (Beckman). Осадок ресуспендировали в 10 мМ фосфатном буфере (pH 7.0) и полученную суспензию осветляли центрифугированием в центрифуге Beckman J2-21 при 8000 об/мин в течение 20 мин. Цикл дифференциального центрифугирования повторяли 2–3 раза. Выход ВТМ составлял около 1 г из 1 кг листьев. Вирусные суспензии после добавления нескольких капель хлороформа хранили при +4°C.

Конструирование гена вакцинного белка Flu1-3-(His)₆. Для синтеза кДНК методом обратной транскрипции использовали 5 мкг выделенной суммарной РНК, 60 пмоль специфического праймера, комплементарного фрагменту последовательности ГА, кодирующей гептапептид РТТ_YISV, и 200 ед. акт. обратной транскриптазы M-MuLV (Fermentas, Латвия) согласно протоколу производителя. Смесь инкубировали в течение 5-10 мин при 70°C, после чего переносили на лед и охлаждали в течение 3 мин. К реакционной смеси добавляли прилегающий к ферменту буфер и 2 мкл 10 мМ раствора дезоксиолигонуклеотидтрифосфатов (dNTP), после чего инкубировали при 42°C в течение 2 мин. Добавляли обратную транскриптазу и инкубировали 50 мин при 42°C. Реакцию останавливали инкубированием при 70°C в течение 15 мин. Полученную кДНК хранили при -20°C. ПЦР проводили в амплификаторе модели PTC 100 (BioRad, США) в объеме 20 мкл; смесь содержала 5 ед. *Taq*-полимеразы, 20 пмоль каждого из специфических праймеров (прямого, кодирующего последовательность гептапептида DLDGVKP, и обратного, кодирующего последовательность гептапептида РТТ_YISV) (см. рис. 5), 1 мкл кДНК из реакции обратной транскрипции, 0.2 мМ dNTP, 60 мМ Трис-НСl pH 8.5, 1.5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ меркаптоэтанол, 0.1% Тритон X-100.

Продукты ПЦР очищали с помощью электрофореза в 1.5% агарозном геле и клонировали в вектор pQE30 (Qiagen). Полученный вектор pQE-NA1-3 обеспечивает

биосинтез рекомбинантного целевого фрагмента гемагглютинина Flu1-3 с *N*-концевой олигогистидиновой последовательностью и *C*-концевым глицилсериновым линкером.

Экспрессия и очистка вакцинного белка Flu1-3-(His)₆. Векторной плазмидой pQE-NA1-3 трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма M15, содержащие высококопийную репрессорную плазмиду pRep-4. Для этого 0.5 мл ночной культуры клеток *E. coli* высевали в 40 мл LB-среды (бакто-триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 5 г/л), содержащей канамицин в концентрации 50 мкг/мл, и выращивали при качании 200 об/мин около 2 ч при +37°C. Затем клетки осаждали центрифугированием при 6000 об/мин при +4°C и ресуспендировали осадок в 25 мл охлажденного до +4°C раствора 10 мМ Трис-НСl pH 7.8, 50 мМ CaCl₂. Суспензию инкубировали 20 мин при 0°C. Затем повторно центрифугировали при 6000 об/мин в течение 5 мин, осадок ресуспендировали в 2.5 мл раствора 50 мМ Трис-НСl pH 7.8, 50 мМ CaCl₂ и инкубировали 30 мин при 0°C. Суспензию полученных таким образом компетентных клеток (200 мкл) смешивали с 1 мкл раствора плазмидной РНК (0.1 мкг/мкл), инкубировали 10 мин во льду и затем клетки высевали на теплые (предварительно подогретые при +37°C) чашки Петри с 1.5% агаром, приготовленном на LB-среде и содержащим ампициллин (50 мкг/мл) и канамицин (50 мкг/мл). Чашки Петри инкубировали при 37°C около 18 ч. Для индукции экспрессии рекомбинантных белков полученные культуры высевали в жидкую среду LB, содержащую ампициллин (100 мкг/мл) и канамицин (50 мкг/мл), и выращивали при температуре 37°C. Когда оптическая плотность культуры (A_{600}) достигла 0.3, добавляли изопропил- β -D-тиогалактозид (IPTG) до конечной концентрации 1 мМ, после чего клетки инкубировали еще в течение 4–12 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием при 6 000 *g* в течение 15 мин при температуре 4°C. Для очистки Flu1-3-(His)₆ использовали Ni-NTA-колонки (Qiagen).

Супернатант, полученный по методике производителя аффинной колонки (Qiagen) и содержащий растворимые тельца включения в 6 М гуанидин-НСl или в 8 М мочеvine в 20 мМ PBS, pH 7.4, наносили на Ni-содержащую колонку (Qiagen), предварительно обработанную 6 М гуанидин-НСl в PBS или 8 М мочеvine в PBS. После нанесения пробы колонку промывали 6 М гуанидин-НСl или 8 М мочеvine в PBS. Целевой белок был элюирован в линейном градиенте концентрации имидазола (10–500 мМ) в 6М гуанидин-НСl или 8М мочеvine в PBS.

Суммарный экстракт и очищенный белок Flu1-3-(His)₆ изучали с помощью электрофореза в ПААГ как описано ранее [23]. Полученный белок давал при электрофорезе единственную полосу с расчетной молекулярной массой.

Электронная микроскопия. Материал наносили на сеточки с формваровой пленкой-подложкой и контрастировали 2% водным раствором уранилацетата. Образцы анализировали с помощью микроскопа JEOL JEM-1911 (JEOL) при увеличениях от 20000 до 100000 раз. Цифровые изображения получали с использованием камеры Gatan Erlangshen ES500W и программного обеспечения Gatan Digital Micrograph™.

ПЭВП получали кватернизацией поли-4-винилпиридина со степенью полимеризации 600 (Aldrich) бромистым этилом в 10% спиртовом растворе. Полученный полимер осаждали из реакционной смеси в сухой диэтиловый эфир, осадок промывали эфиром и сушили в вакууме. Степень алкилирования, определенная методом ИК-спектроскопии, составила 95%. Концентрация полимера дана в молях катионных (кватернизованных) групп в литре раствора (молярность по поли-4-винилпиридину).

Электрофоретическую подвижность вирусных частиц и их комплексов с ПЭВП, БСА и Flu1-3 измеряли с использованием лазерного микроэлектрофореза на приборе Brookhaven 90 Plus (Brookhaven Instruments, США) в термостатируемой ячейке.

Измерение интенсивности флуоресценции вирусной суспензии и комплексов проводили на спектрофлуориметре F-4000 (Hitachi, Япония). Измерения pH растворов проводили на pH-метре pH-210 (Hanna, США) с комбинированным измерительным электродом HI 1131В.

Иммунизация мышей. Для получения препарата наночастиц ВТМ–ПЭВП–Flu1-3 (тройной комплекс) на первом этапе 100 мкл суспензии ВТМ с концентрацией 1 мг/мл смешивали со 100 мкл раствора ПЭВП (концентрация 4×10^{-5} М). Смешивание производили при постоянном перемешивании. Затем к полученной смеси добавляли 40 мкл раствора Flu1-3 в воде (концентрация 250 мкг/мл). Конечный тройной комплекс использовали для иммунизации мышей (в дозе 10 мкг Flu1-3 на мыш, что соответствует 240 мкл комплекса/мыш). В случае иммунизации БСА и БСА-FITC также добавляли 40 мкл раствора белка в дистиллированной воде с концентрацией 100 мкг/мл (в пересчете на БСА).

Для оценки иммуногенности 100 мкл суспензии тройного комплекса ВТМ–ПЭВП–Flu1-3 вводили внутривенно мышам линии BALB/c (самки, вес 20 г, питомник «Столбовая»), в первый раз с полным адъювантом Фрейнда (Sigma) в соотношении 1 : 1, во второй и третий раз – с неполным адъювантом Фрейнда (Sigma). Контрольной группе животных вводили раствор Flu1-3 в дозе 10 мкг Flu1-3 на мыш в PBS pH 7.4 по аналогичной схеме с полным и неполным адъювантом Фрейнда. Иммунизацию мышей проводили трижды с интервалом в 2 недели. Кровь для антисыворотки брали на 8-й день после последней иммунизации.

Иммуноферментный анализ. Для анализа специфических антител использовали непрямой ИФА-анализ в стандартном варианте. Для сенсibilизации полистирольной плашки антиген Flu1-3-(His)₆ в концентрации 5 мкг/мл в воде наносили на планшеты для ИФА (Costar) по 50 мкл на лунку, затем планшет инкубировали при +4⁰С в течение ночи. Далее после трехкратного промывания лунок буфером PBS с 0.05% Твин-20 в лунки вносили по 50 мкл 1% раствора БСА в PBS, плашку инкубировали на качалке 1 ч при комнатной температуре. После трехкратного промывания лунок буфером PBS с 0.05% Твин-20 в лунки добавляли по 50 мкл поликлональной антисыворотки мышей в различных разведениях: исходную сыворотку разводили в 100 раз PBS и делали еще несколько последовательных разведений с шагом в 3 раза от 1 : 300 до 1 : 220 000. После добавления первичных антител плашку инкубировали на качалке 1.5 ч при комнатной температуре. Несвязавшиеся антитела отмывали трехкратным промыванием лунок буфером PBS с 0.05% Твин-20, в лунки добавляли по 50 мкл разведенных в 2000 раз вторичных кроличьих антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой (Rabbit-anti Mouse IgG anti-whole molecule Alkaline Phosphatase conjugate, Sigma). Далее плашку инкубировали на качалке 1 ч при комнатной температуре, отмывали несвязавшиеся антитела трехкратным промыванием лунок буфером PBS с 0.05% Твин-20 и добавляли в каждую лунку по 50 мкл раствора субстрата для щелочной фосфатазы (натриевая соль ди-4-нитрофенилфосфата, Serva). Субстрат растворяли в 0.1 М диэтаноламиновом буфере (48.5 мл диэтаноламина фирмы Serva добавляли к 400 мл H₂O, доводили pH до 9.8 концентрированной HCl, добавляли 5 мкл 5 мМ MgCl₂ и доводили H₂O до 500 мл) до концентрации 5 мг/мл. Реакцию проводили в темноте 40–60 мин, затем анализировали на спектрофотометре Multiscan (США) при длине волны 405 нм.

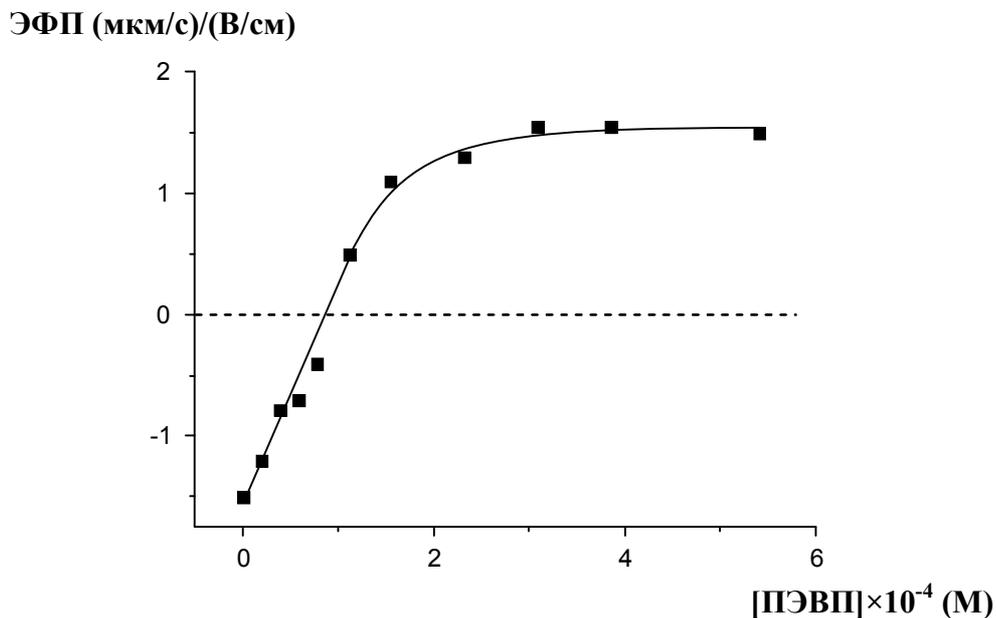
БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа была выполнена при поддержке Государственного контракта № 02.527.11.0002 в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Атабеков И.Г.* // Российские нанотехнологии. 2008. Т. 3. С. 130–139.
2. *Nandedkar T.D.* // J. Biosci. 2009. V. 34. P. 995–1003.
3. *Whitacre D.C., Lee B.O., Milich D.R.* // Expert Rev. Vaccines. 2009. V. 8. P. 1565–1573.
4. *Cliffel D.E., Turner B.N., Huffman B.J.* // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 2009. V. 1. P. 47–59.
5. *Evans D.J.* // Biochem. Soc. Trans. 2009. V. 37. P. 665–670.
6. *Steinmetz N.F., Lin T., Lomonosoff G.P., Johnson J.E.* // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2009. V. 327. P. 23–58.
7. *Sapsford K.E., Soto C.M., Blum A.S., Chatterji A., Lin T., Johnson J.E., Ligler F.S., Ratna B.R.* // Biosens. Bioelectron. 2006. V. 21. P. 1668–1673.
8. *Ren Y., Wong S.M., Lim L.Y.* // Pharm. Res. 2010. V. 8. P. 25–41.
9. *Koprowski H., Yusibov V.* // Vaccine. 2001. V. 19. P. 2735–2741.
10. *Cañizares M.C., Lomonosoff G.P., Nicholson L.* // Expert Rev. Vaccines. 2005. V. 4. P. 687–697.
11. *Yusibov V., Rabindran S., Commandeur U., Twyman R.M., Fischer R.* // Drugs R D. 2006. V. 7. P. 203–217.
12. *McCormick A.A., Palmer K.E.* // Expert Rev. Vaccines. 2008. V. 7. P. 33–41.
13. *Portney N.G., Destito G., Manchester M., Ozkan M.* // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2009. V. 327. P. 59–69.
14. *Sugiyama Y., Hamamoto H., Takemoto S., Watanabe Y., Okada Y.* // FEBS Lett. 1995. V. 359. P. 247–250.
15. *Bendahmane M., Koo M., Karrer E., Beachy R.N.* // J. Mol. Biol. 1999. V. 290. P. 9–20.
16. *Denis J., Acosta-Ramirez E., Zhao Y., Hamelin M.E., Koukavica I., Baz M., Abed Y., Savard C., Pare C., Lopez Macias C., Boivin G., Leclerc D.* // Vaccine. 2008. V. 26. P. 3395–3403.
17. *Brennan F.R., Jones T.D., Hamilton W.D.* // Mol. Biotechnol. 2001. V. 17. P. 15–26.
18. *Nemchinov L.G., Natilla A.* // Protein Expr. Purif. 2007. V. 56. P. 153–159.
19. *Gillitzer E., Willits D., Young M., Douglas T.* // Chem. Commun. (Camb). 2002. V. 21. P. 2390–2391.
20. *Wang Q., Lin T., Tang L., Johnson J.E., Finn M.G.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2002. V. 41. P. 459–462.
21. *Chatterji A., Ochoa W., Shamieh L., Salakian S.P., Wong S.M., Clinton G., Ghosh P., Lin T., Johnson J.E.* // Bioconjug. Chem. 2004. V. 15. P. 807–813.
22. *McCormick A.A., Corbo T.A., Wykoff-Clary S., Palmer K.E., Pogue G.P.* // Bioconjug. Chem. 2006. V. 17. P. 1330–1338.
23. *Makarov V.V., Rybakova E.N., Efimov A.V., Dobrov E.N., Serebryakova M.V., Solovyev A.G., Yaminsky I.V., Taliansky M.E., Morozov S.Y., Kalinina N.O.* // J. Gen. Virol. 2009. V. 90. P. 3022–3032.

РИСУНКИ



Исправить по бум. версии!

Рис. 1. Зависимость ЭФП частиц ВТМ от концентрации ПЭВП при формировании комплекса ВТМ–ПЭВП. Концентрация ВТМ 1 мг/мл; 10⁻²М Трис-НСl-буфер, рН 7.5.

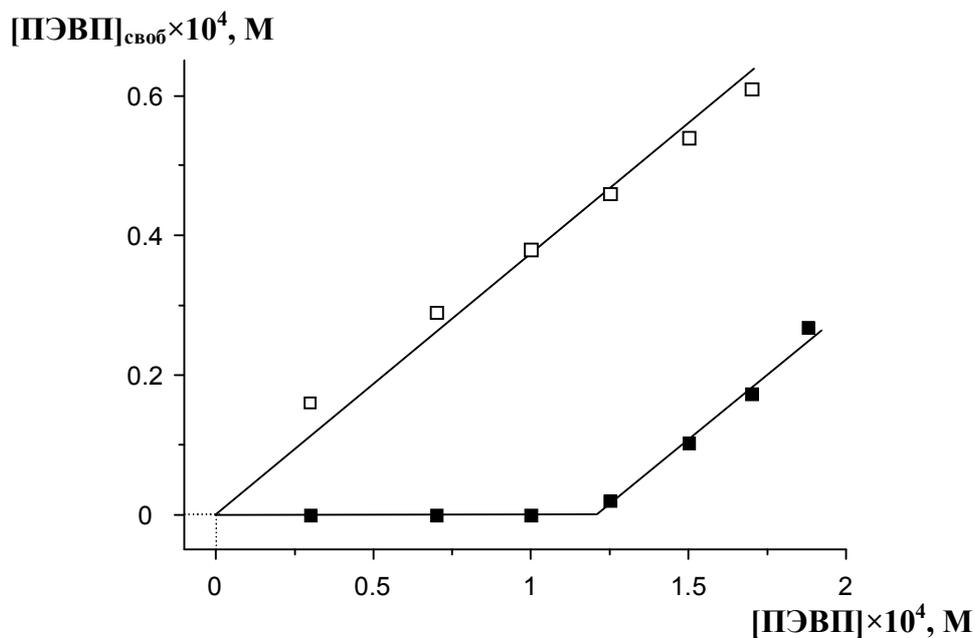


Рис. 2. Зависимость концентрации ПЭВП, несвязанного с частицами вириона, от его общей концентрации в системе формирования комплекса ВТМ–ПЭВП (1); 2 – калибровочная кривая. Условия см. подпись к рис. 1.

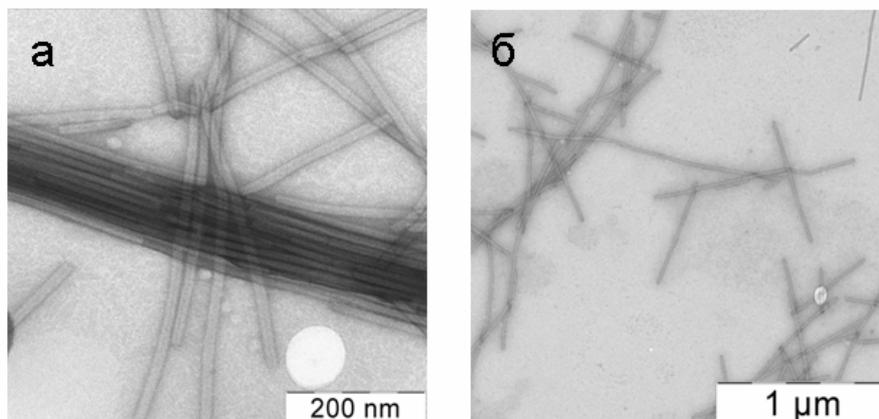


Рис. 3. Электронные микрофотографии бинарного комплекса ВТМ-ПЭВП (*a*) и тройного комплекса ВТМ-ПЭВП-БСА (*б*).

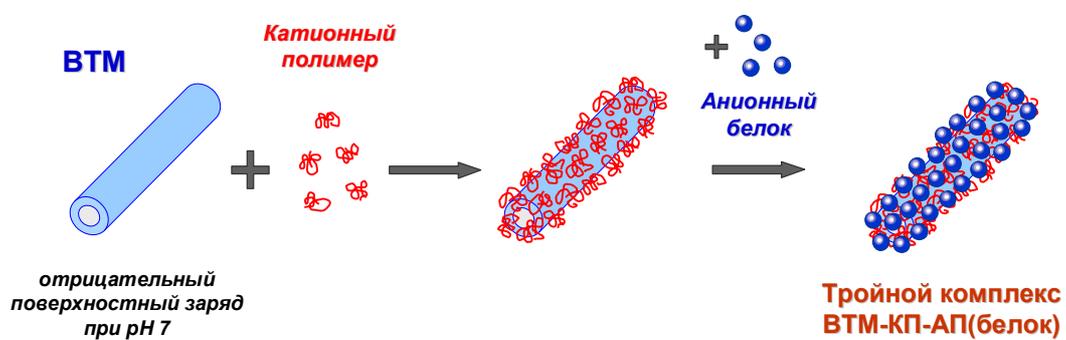


Рис. 4. Общая схема формирования тройного комплекса ВТМ-катионный полимер (КП)-анионный белок (АБ).

MRGSHHHHHH**SGGGGSS**DLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFNLNPEWSYIVEKINPANDLCYPGNFNDYEELKHL
 LSRINHFEKIQII PKSSWS DHEASSGVSSACPYQGRSSFFRNVVWLIKDNAYPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDA
 AEQTRLYQNPTTYISV**GSTSSGG**

Рис. 5. Аминокислотная последовательность рекомбинантного полипептида Flu1-3. Подчеркнут участок, содержащий шесть гистидиновых остатков, включенных в состав белка для его аффинной очистки. Жирным шрифтом выделены фланкирующие последовательности, содержащие преимущественно остатки серина и глицина. Серым выделен участок, соответствующий фрагменту ГА.

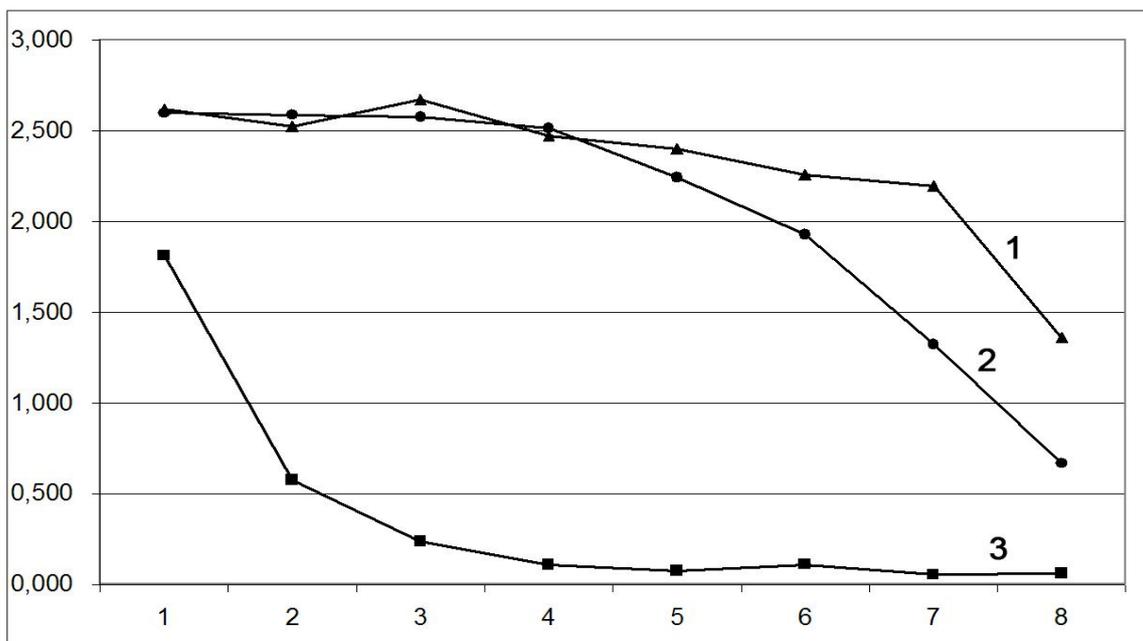


Рис. 6. Результаты непрямого ИФА с использованием антисыворотки, полученной к тройному комплексу ВТМ–ПЭВП–Flu1-3 (1) и к к фрагменту Flu1-3 (2); кривая 3 – контрольная сыворотка от неиммунных мышей. Каждая из антисывороток представляла собой пул сывороток, полученных от группы из 5 мышей. Ось ординат – A_{405} , интенсивность окраски субстрата щелочной фосфатазы; ось абсцисс – разведения антисыворотки 1 : n, где n = 100 (1), 300 (2), 900 (3), 2700 (4), 8100 (5), 24300 (6), 72900 (7), 218700 раз (8).

A New Method of Producing Biologically Active Nanocomplexes by Non-Covalent Conjugation of Proteins with Viral Particles

A. A. Yaroslavov*, I. B. Kaplan[#], T. N. Erokhina**, S. Yu. Morozov*, A. G. Solovyev*,
A. D. Leschiner*, A. A. Rokhnyanskaya*, A. S. Malinin*, L. A. Stepanova***, O. I.
Kiselev***, J. G. Atabekov*

[#]Phone: +7(495) 939-33-47; fax: +7 (495) 939-31-81; e-mail: igor_b_kaplan@yahoo.com

*Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia

**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russia

***Research Institute of Influenza of Ministry Public Health and Social Development of Russian
Federation, St. Petersburg Russia

A new method for noncovalent immobilization of a peptide epitope on the surface of the virion to simplify and standardize procedures for viral nanocomplexes have been developed. Effectiveness of the approach is shown in the example of a model system consisting of tobacco mosaic virus, a synthetic cationic polymer, poly-*N*-ethyl-4-vinylpyridinium bromid, and the model polypeptide. The principle of sequential adsorption, the underlying triple system of obtaining virion-polycation-protein, was used for the electrostatic immobilization of recombinant viral surface of the hydrophilic fragment of the influenza virus haemagglutinin (Flu1-3). It has resulted in a significant increase of immunogenic activity of such artificial vaccine protein.

Key words: *nanocomplexes, viral particles, conjugation with proteins, polycation, haemagglutinin, immunization.*