

# Создание кандидатной вакцины против клещевого энцефалита на основе гибридного рекомбинантного flagG-protE-белка

П.А. Белавин<sup>1</sup>✉, Д.А. Кунык<sup>1</sup>, Е.В. Протопопова<sup>2</sup>, В.Б. Локтев<sup>1, 2</sup>, Е.В. Дейнеко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

В настоящей работе описаны конструирование гена, кодирующего гибридный белок flagG-protE, синтез и очистка полученного рекомбинантного белка, а также исследование его антигенных характеристик на панели моноклональных антител (МКА). Рекомбинантный белок flagG-protE является перспективной молекулой для создания кандидатной рекомбинантной вакцины против клещевого энцефалита благодаря способности к связыванию с МКА против природного белка Е вируса клещевого энцефалита. Проведено исследование антигенных детерминант двух рекомбинантных белков protE и flagG-protE с помощью панели из восьми МКА. Рекомбинантный белок protE представлен белком оболочки вируса клещевого энцефалита, в рекомбинантном белке flagG-protE к нему добавлен домен flagG, кодирующий флагеллин G *Salmonella typhi*. Установлено, что изучаемые МКА связывались с эпитопами рекомбинантного белка protE. Это свидетельствует о том, что исследуемый рекомбинантный белок имеет антигенную структуру, схожую с антигенной структурой нативного белка Е вируса клещевого энцефалита. При исследовании рекомбинантного белка flagG-protE по способности к связыванию с панелью из восьми МКА только пять из них были способны связываться с эпитопами рассматриваемого белка. МКА 4F6, 7F10 и 6B9 не узнавали соответствующий эпитоп рекомбинантного белка flagG-protE, тогда как в рекомбинантном белке protE эти эпитопы выявлялись успешно. Полученные данные свидетельствуют о том, что антигенная структура рекомбинантного protE-белка может быть изменена под влиянием флагеллинового домена, что, в свою очередь, может привести к недоступности некоторых антигенных детерминант. Это обстоятельство необходимо учитывать при конструировании рекомбинантных антигенов. Тем не менее принципиально важные районы в области пептида слияния и домена III оказались доступны для антител. Это должно обеспечить формирование нейтрализующих антител, а наличие полной аминокислотной последовательности белка Е в составе рекомбинантного белка будет индуцировать формирование Т-клеточного иммунного ответа. Появление нового поколения вакцин против клещевого энцефалита с более высоким уровнем безопасности и иммуногенности позволит усовершенствовать вакцинопрофилактику населения от клещевого энцефалита.

Ключевые слова: флагеллин G; белок оболочки; адъювант; ВКЭ; иммуногенность; вакцина.

## Candidate vaccine construction against tick-borne encephalitis based on hybrid recombinant flagG-protE-protein

P.A. Belavin<sup>1</sup>✉, D.A. Kunyk<sup>1</sup>, E.V. Protopopova<sup>2</sup>, V.B. Loktev<sup>1, 2</sup>, E.V. Deineko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk region, Russia

The present work describes the construction of the gene encoding the recombinant protein flagG-protE, its synthesis, purification and study. The recombinant flagG-protE protein is a promising molecule for developing a candidate recombinant vaccine against tick-borne encephalitis by the ability to bind to monoclonal antibodies (MCA) against native protein E of tick-borne encephalitis virus. The antigenic determinants of two recombinant proteins were studied: protE and flagG-protE using a panel of 8 MCA. The recombinant protein protE comprises the tick-borne encephalitis virus envelope protein and the flagG-protE recombinant protein has an additional flagG domain encoding flagellin G of *Salmonella typhi*. It was found that the MCA tested revealed epitopes on the recombinant protein protE. This indicates that the investigated recombinant protein has an antigenic structure similar to the antigenic structure of the native tick-borne encephalitis virus protein E. In the study of the recombinant protein flagG-protE by the ability to bind a panel of 8 MCA, only five of them react with epitopes of the tested protein. MCA 4F6, 7F10, and 6B9 did not recognize the corresponding epitope in the recombinant flagG-protE protein, while in the recombinant protein protE, these epitopes were detected successfully. Our data indicate that the antigenic structure of recombinant protE-protein can be changed under the influence of the flagellin domain, which in turn can lead to the unavailability of some antigenic determinants. This fact must be taken into account when constructing recombinant molecules with antigenic properties. Nevertheless, the fundamentally important regions in the region of the fusion peptide and III domain are antigenically present on the surface of the recombinant protein. This should ensure the formation of neutralizing antibodies, and the presence of a complete amino acid sequence of protein E in the recombinant protein induces the formation of a T-cell immune response. The emergence of a new generation of vaccines against tick-borne encephalitis

with a higher level of safety and immunogenicity will improve the vaccine prevention of the population from tick-borne encephalitis.

Key words: flagellin G; envelope protein; adjuvant; TBE; immunogenicity; vaccine.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Белавин П.А., Кунык Д.А., Протопопова Е.В., Локтев В.Б., Дейнеко Е.В. Создание кандидатной вакцины против клещевого энцефалита на основе гибридного рекомбинантного flagG-protE-белка. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017; 21(8):986-992. DOI 10.18699/VJ17.323

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Belavin P.A., Kunyk D.A., Protopopova E.V., Loktev V.B., Deineko E.V. Candidate vaccine construction against tick-borne encephalitis based on hybrid recombinant flagG-protE-protein. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017; 21(8):986-992. DOI 10.18699/VJ17.323 (in Russian)

Флавивirusы способны инфицировать широкий круг организмов, которые включают в себя различные виды млекопитающих (в том числе человека), а также насекомых, птиц, рептилий. Сотни миллионов случаев заболевания человека, вызываемые различными флавивirusами, регистрируются в разных географических регионах мира (Grard et al., 2007; Локтев, 2011). Для России наибольшее медицинское значение имеет вирус клещевого энцефалита (Korenberg, Kovalevskii, 1999), который был открыт в 1937 г. на Дальнем Востоке. Фактически одновременно были созданы первые инактивированные вакцины против этой инфекции (Зильбер, 1939). Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) вызывает у людей заболевание центральной нервной системы с уровнем смертности 1–2 % для европейского и сибирского генотипов и до 30 % для дальневосточного (Gritsun et al., 2003). Вирус широко распространен на севере Евразийского континента, где ежегодно регистрируется до 14 тыс. случаев заболевания. Заболеваемость клещевым энцефалитом регистрируется более чем в 25 европейских и семи азиатских странах (Charrel et al., 2004; Amicizia et al., 2013). Недавно опубликованы данные о широком распространении и заболеваемости КЭ в Китае (Yoshii et al., 2017). На территории России ежегодно регистрируется от 1.5 до 10 тыс. случаев заболевания (Злобин, 2010). В последние годы наблюдается очень существенный рост – более чем в 50 раз, заболеваемости клещевым энцефалитом в северных регионах европейской части страны (Глушкова и др., 2011; Tokarevich et al., 2011; Микрюкова и др., 2014).

Для вакцинации против КЭ широко используют четыре типа инактивированных вакцин, производимых в России (штаммы 205 и Софьин), Австрии (Neudorfl) и Германии (K23) (Leonova et al., 2007; Morozova et al., 2014). На территории Китая с 1953 г. применяют оригинальную инактивированную вакцину против ВКЭ на основе штамма Zen-Zhang (Yoshii et al., 2017). Фактически только в Австрии удалось установить контроль над заболеваемостью КЭ при помощи вакцинации (Heinz et al., 2013). В России, в Свердловской области иммунизировано 86.1 % населения, что позволило также резко снизить заболеваемость КЭ в этом регионе (Государственный доклад..., 2017).

Основным иммуногеном, индуцирующим появление вируснейтрализующих антител, является гликопротеин Е вируса клещевого энцефалита (Heinz, Stiasny, 2012). Бактериальный флагеллин – перспективный и эффективный природный адъювант, усиливающий иммунный ответ против флавивirusов (McDonald et al., 2007). Гибридная

молекула, несущая основные домены вирусного белка Е и флагеллина G, может стать основой для конструирования кандидатной рекомбинантной вакцины против ВКЭ с усиленной иммуногенностью. Можно предположить, что применение рекомбинантной вакцины приведет к упрощению схемы иммунизации, обеспечит формирование длительного иммунитета, повысит безопасность вакцины и позволит создать новые биотехнологические схемы для наработки кандидатной вакцины, в том числе с использованием клеток растений.

В настоящей работе описано создание гена белка flagG-protE, его экспрессия, очистка белка flagG-protE как основного специфического компонента рекомбинантной вакцины против КЭ, исследование с помощью панели моноклональных антител к гликопротеину Е ВКЭ сохранности основных антигенных детерминант рекомбинантной молекулы. Обсуждается перспективность гибридного белка flagG-protE для возможного использования в качестве кандидатной вакцины против ВКЭ с усиленной иммуногенностью.

## Материалы и методы

**Клонирование целевых генов.** ДНК выделяли с помощью коммерческого «набора для выделения плазмидной ДНК» (ООО «Цитокин», г. Санкт-Петербург) согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Для получения фрагментов ДНК генов *TBEVgp1* и гена *fliG* применяли ПЦР с праймерами, содержащими линкерные последовательности для эндонуклеаз рестрикции: *Bse3DI*, *BglII* и *HindIII* (табл. 1). В качестве матрицы использовали pHis6-protE и pHis6-flagG. Компетентные клетки получали по стандартной методике (Гловер, 1988). Клетки хранили при –70 °С.

**Наработка и очистка белка.** Клетки *Escherichia coli* BL21(DE3), несущие соответствующую плазмиду, засеивали в ночь в 5 мл LB, содержащей ампициллин (50 мг/мл). На следующий день инокулировали 1 мл ночной культуры в 100 мл LB с ампициллином (50 мкг/мл). Инкубировали на качалке в течение 2 ч при 37 °С и 180 об/мин. Индукцию биосинтеза рекомбинантного белка проводили добавлением 1 мл раствора 100 мМ ИПТГ. Продолжали культивировать на протяжении 5 ч. Биомассу собирали центрифугированием: 4000 об/мин, 10 мин (центрифуга Avant, ротор JLA-16-250, США).

Полученную биомассу ресуспендировали в 4 мл фосфатно-солевого буфера, содержащего 10 мМ имидазола и 2 М мочевины (pH 8.0), и обрабатывали ультразвуком

**Table 1.** PCR-primers for cloning *fliG-TBEVgp1* gene

| Primer            | Nucleotide sequence   |
|-------------------|---|
| U-BglII-flaG      | 5'- <u>CCCAGATCT</u> ATGGCGCAGGTGATTAACACCA-3'                |
| L-Bse3DI-link fla | 5'- <u>CCC</u> GCAATG <u>CCC</u> CGCGCCGCGCAGCAGGCTCAGCACG-3' |
| U-Bse3DI_protE    | 5'- <u>CCC</u> GCAATGGGTATGCCTCACGATGCACACATCTG-3'            |
| L-HindIII_protE   | 5'- <u>CCCAAGCTT</u> ATATGCCTTTCTGGTTT-3'                     |

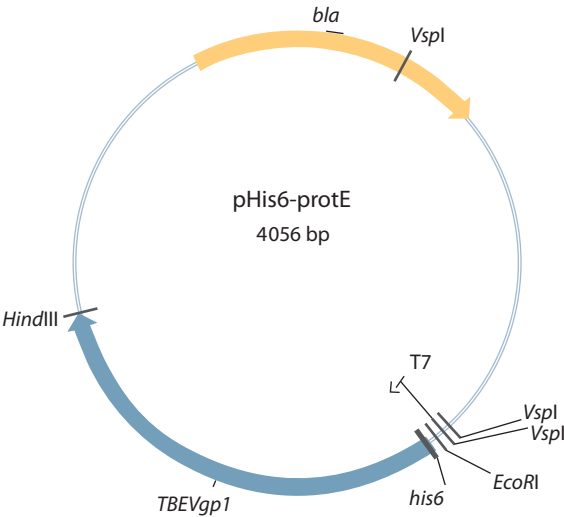
Amplicon lengths: the flagellin gene, 1518 bp; the glycoprotein E gene, 1257 bp; the hybrid gene (at cloning restriction sites), 2770 bp. The recognition sites for restriction endonucleases are shown in boldface; hydrolysis sites for *Bse3DI*, in gray; and complementarity regions are underlined.

на ультразвуковой установке для лизиса клеток Cole-Parmer. Режим работы: мощность 35 Вт, 5 импульсов по 30 с с промежуточным охлаждением во льду 1 мин. Лизат центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин, супернатант удаляли (центрифуга Eppendorf miniSpin plus, ротор f-45-12-11). Осадок (тельца включения) суспендировали в 4 мл фосфатно-солевого буфера, содержащего 10 мМ имидазола и 8 М мочевины (pH 8.0), обрабатывали ультразвуком и центрифугировали в течение 5 мин при 10000 об/мин. Супернатант наносили на уравновешенную колонку с Ni-NTA-смолой (1 мл). После промывки связавшийся белок элюировали фосфатно-солевым буфером, содержащим 8 М мочевины и 250 мМ имидазола. Концентрацию белка в растворе измеряли методом Бредфорда (Bradford, 1976). Белковый электрофорез проводили по методике, описанной в работе (Laemmli, 1970).

**МКА и иммуноферментный анализ.** Моноклональные антитела (МКА) против ВКЭ получали с использованием гибридов, описанных ранее (Гайдамович и др., 1990; Протопопова и др., 1996; Романова и др., 2006). Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили по общепринятым методикам с применением инактивированных вирусных и рекомбинантных антигенов (Разумов и др., 1991). С этой целью в лунки полистироловых планшетов вносили по 100 мкл очищенного антигена в концентрации 5–10 мкг/мл и сорбировали при 4 °C в течение ночи. Места неспецифического связывания насыщали 0.5 % раствором казеина в буфере ТСБ-Твин (0.145 М хлористого натрия, 20 мМ трис-HCl, 5 мМ PMSF (Sigma, США), содержащем 0.1 % Твин 20 (Serva, Германия), pH 7.4, 1 ч при 37 °C. Затем инкубировали с МКА 1 ч при 37 °C. Специфическое связывание выявляли антивидовыми мечеными пероксидазой хрена антителами против IgG. В качестве хромогена использовали раствор О-фенилендиамина (1 мг/мл орто-фенилендиамина, 0.03 % перекиси водорода) в цитратно-фосфатном буфере (0.2 М лимонной кислоты, 0.5 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 5.0). Выдерживали 20 мин в темноте, останавливали реакцию добавлением 100 мкл 1 N HCl в лунку и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Uniscan (Финляндия) со светофильтром с максимумом пропускания 450 нм.

**Результаты**

Конструирование гена, кодирующего гибридный белок flagG-protE, было выполнено при помощи метода Golden Gate Cloning (Engler et al., 2008). Метод основан на использовании эндонуклеаз рестрикции IIS-типа для получения фрагментов с уникальными липкими концами и

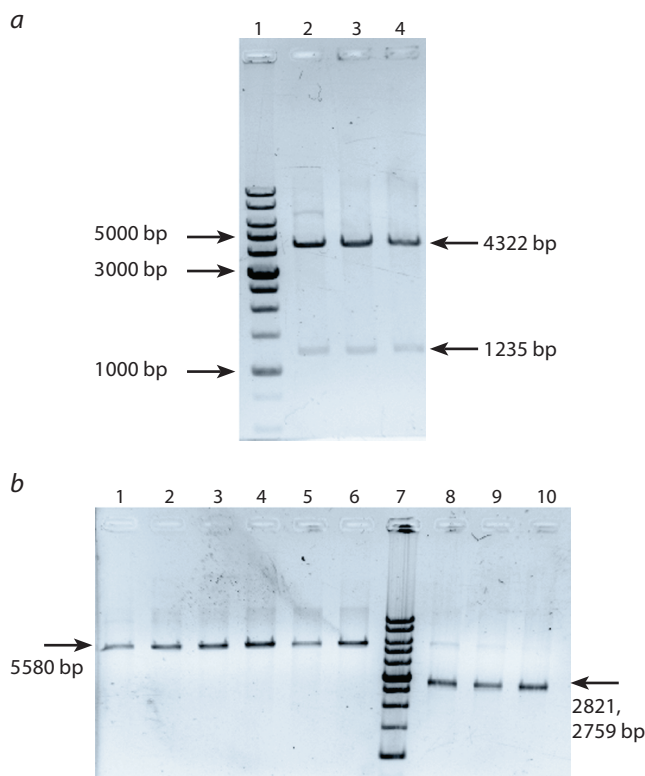


**Fig. 1.** Map of plasmid pHis6-protE. Designations: *HindIII*, *EcoRI*, and *VspI* are restriction sites with corresponding endonucleases; *bla*, gene for ampicillin resistance; T7, phage T7 promoter; *his6*, a tag of 6 histidines; *TBEVgp1*, gene encoding protE. Arrows indicate the direction of transcription.

при лигировании позволяет оперировать более чем двумя фрагментами одновременно. Фрагмент гена *flaG* получен с помощью ПЦР с использованием праймеров с введенными сайтами узнавания для рестриктаз *BglII* и *Bse3DI*. Второй фрагмент гена *TBEVgp1* размером 1257 п. о., кодирующий белок protE, синтезирован с использованием праймеров с введенными сайтами узнавания для рестриктаз *Bse3DI* и *HindIII* и амплифицирован с плазмиды pHis6-protE (рис. 1).

Фрагменты ДНК после гидролиза соответствующими рестриктазами и очистки в 1 % агарозном геле при помощи «набора для очистки ДНК» («Цитокин», Санкт-Петербург) лигировали с вектором, полученным из pHis6-protE после обработки *HindIII* и *BglII*. Лигазную смесь использовали для трансформации клеток *E. coli*. По результатам рестрикционного анализа с участием эндонуклеаз рестрикции *VspI*, *EcoRI* и *HindIII* среди 24 независимо полученных клонов бактерий, устойчивых к ампициллину, выделено 8 клонов с ожидаемой для гена pHis6-*flaG-protE* картиной рестрикции (рис. 2).

Сравнивая расчетные данные и данные электрофореза, можно сделать вывод, что все сайты рестрикции ДНК плазмид располагаются правильно и отобранные клоны



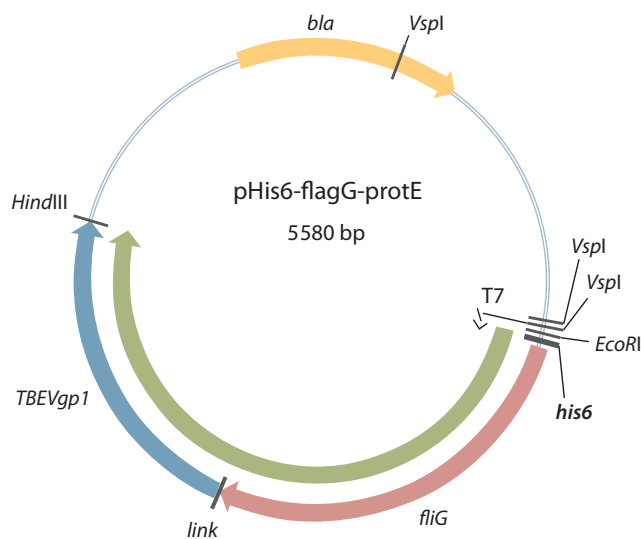
**Fig. 2.** Electrophoretic analysis of pHis6-flagG-protE clones: (a) Analysis of clones using the restriction enzyme *VspI* (lanes 2–4). Lane 1: 1-kb molecular weight ladder, SibEnzyme, Russia (16 fragments, bp: 10,000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000×2, 2500, 2000, 1500, 1000×2, 750, 500×2, 250). (b) Analysis of clones using restriction enzymes *EcoRI* (lanes 1–3) and *HindIII* (lanes 4–6), double hydrolysis with these endonucleases (lanes 8–10), SibEnzyme molecular weight ladder (lane 7). Expected fragment sizes, bp: with *VspI*, 4322 and 1235 bp; with *EcoRI*, 5580 bp; with *HindIII*, 5580 bp; with *EcoRI* + *HindIII*, 2821 and 2759 bp.

содержат целевую плазмиду pHis6-flagG-protE, которая включает ген, кодирующий рекомбинантный гибридный белок flagG-protE (рис. 3). Секвенирование плазмиды pHis6-flagG-protE подтвердило отсутствие мутаций и правильность сборки конструкции.

Обе конструкции (а именно *his6\_TBEVgp1* и *fliG\_TBEVgp1*) депонированы в GenBank: MG458224 – ген *his6\_TBEVgp1*, кодирующий protE; MG458225 – ген *fliG\_TBEVgp1*, кодирующий flagG-protE.

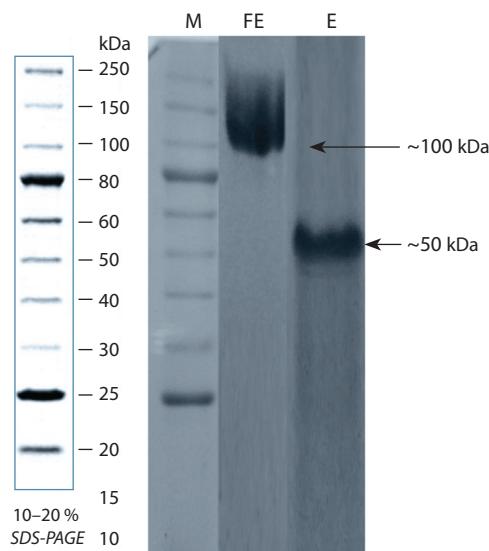
Анализ препаратов рекомбинантных белков проводили в 12 % полиакриламидном денатурирующем белковом электрофорезе. Расчетные молекулярные массы flagG-protE (101275.08 Да) и protE (47832.62 Да) хорошо коррелируют с полученными в эксперименте. На электрофореграмме (рис. 4) видно, что на дорожке FE белковая полоса имеет подвижность около 100 кДа, а на дорожке E – около 50 кДа. Кроме того, белковые полосы не имеют видимых примесей, что свидетельствует о чистоте полученных препаратов flagG-protE и protE.

Очищенные рекомбинантные белки protE и flagG-protE были использованы в иммуноферментном анализе с панелью из восьми моноклональных антител, полученных к вирусному гликопротеину E. Антигены сорбировали



**Fig. 3.** Map of plasmid pHis6-flagG-protE.

Designations: *HindIII*, *EcoRI*, and *VspI* are sites of the corresponding restriction endonucleases; *bla*, gene for ampicillin resistance; T7, phage T7 promoter; *his6*, a tag of 6 histidines; *link*, sequence encoding 3 amino acids Gly-Ala-Gly; flagG-E, *fliG* and *TBEVgp1* are genes encoding the flagG and protE domains, respectively. Arrows indicate the direction of transcription.



**Fig. 4.** Electrophoretic analysis of recombinant proteins flagG-protE and protE.

Designations: M, molecular weight ladder; FE, protein flagG-protE; E, protein protE.

на полистирольные планшеты, подвергали стандартным процедурам промывки, сорбции с антителами, конъюгатам и с последующим измерением оптической плотности на спектрофотометре. Результаты ИФА приведены в табл. 2.

По результатам анализа установлено, что панель из восьми моноклональных антител выявляла соответствующие эпитопы рекомбинантного белка protE. Это свидетельствует об антигенной структуре исследуемого рекомбинантного гибридного белка, схожей с антигенной структурой нативного вирусного белка E ВКЭ. Гибридный



**Table 2.** Interaction of monoclonal antibodies with recombinant proteins protE and flagG-protE and with viral antigens from prototype strains of three major TBEV genotypes

| MCA   | MCA-binding epitope on protein E (a. o.) | Recombinant proteins |       | TBEV genotype        |                  |               |                |
|-------|--|----------------------|-------|----------------------|------------------|---------------|----------------|
|       |  | flagG-protE          | protE | european             | siberian         | far-East      |                |
|       |  |                      |       | Strains              |                  |               |                |
|       |  |                      |       | Absettarov, KJ000002 | C11-13, MF043953 | 205, JX498939 | 4072, KF951037 |
| 10H10 | 98–113                                   | +++                  | +++   | ++                   | ++               | ++            | +++            |
| 4F6   | 19–273                                   | –                    | +     | +++                  | +++              | +++           | –              |
| 7F10  | 19–273                                   | –                    | +     | ++                   | ++               | ++            | –              |
| 6B9   | 19–273                                   | –                    | ++    | H.и.                 | H.и.             | ++            | H.и.           |
| 13F6  | 273–429                                  | +++                  | ++    | ++                   | ++               | +             | +++            |
| EB1   | 273–429                                  | ++                   | +     | +++                  | +++              | ++            | +++            |
| E6B   | 273–429                                  | ++                   | +     | ++                   | ++               | ++            | ++             |
| 7D3   | 273–429                                  | +++                  | +++   | +                    | ++               | +             | +              |

The antigen was immobilized on a plate, 200 ng/well. MCA against TBEV protein E were diluted at 1 : 300. Optical densities: +, 0.3–0.8; ++, 0.8–1.5; +++, > 1.5; n.d., not determined. GenBank accession numbers are indicated for TBEV strains. The antigen was obtained by lysing a purified TBEV strain (Leonova et al., 2007) from the collection of virus strains at the Vector Center after genome-wide sequencing.

белок flagG-protE проявляет свои антигенные свойства аналогично рекомбинантному protE и нативному белку E вируса клещевого энцефалита, однако только пять видов МКА взаимодействовали с гибридным белком flagG-protE. МКА 4F6, 7F10 и 6B9 не узнавали эпитоп в гибридном белке при его наличии в составе белка protE. Идентичность аминокислотной последовательности фрагмента белка E в двух рекомбинантных полипептидах позволяет предположить, что эпитопы для МКА 4F6, 7F10 и 6B9 сохраняются в гибридном белке и, по всей вероятности, прикрыты полипептидной цепью флагеллина.

Принципиально важно отметить, что МКА 13F6, EB1, E6B и 10H10 взаимодействовали с гибридной рекомбинантной молекулой flagG-protE белка. МКА 13F6, EB1, E6B опознавали эпитопы домена III белка E, расположенного между 273–429 а.о. Домен III флавивирусов обеспечивает индукцию вируснейтрализующих антител и рецепторное взаимодействие (Ershova et al., 2016). МКА 10H10 распознают так называемый пептид слияния, расположенный в районе 98–113 а.о., который является высококонсервативным для большинства флавивирусов (Морозова и др., 2009). Этот район обеспечивает рецепторное взаимодействие вирусной частицы с ламининсвязывающим белком, участвует в процессе взаимодействия клеточных и вирусных мембран и формирует протективный иммунный ответ в организме (Ershova et al., 2016). Сохранность конформации эпитопов домена III и пептида слияния флавивирусов в составе гибридного белка позволяет предположить, что гибридный белок flagG-protE будет способен индуцировать образование вируснейтрализующих и антирецепторных антител и тем самым формировать полноценный противовирусный иммунитет, защищающий организм от развития инфекционного процесса. При этом флагеллин в составе гибридной молекулы будет дополнительно обладать сильными адьювантными свойствами, что сформирует выраженный и продолжи-

тельный противовирусный иммунитет. Эти свойства гибридного белка flagG-protE дают основание рассматривать его как весьма перспективный для создания кандидатной вакцины против клещевого энцефалита.

**Обсуждение**

Перспективным направлением для создания новых рекомбинантных вакцин является конструирование новых гибридных иммуногенов, несущих в своем составе эффективные природные адьюванты. В составе рекомбинантных вакцин в качестве иммуногенов чаще всего используют белки оболочек вирусов, трансмембранные белки различных инфекционных агентов, несущие эпитопы, узнаваемые антителами. В качестве адьювантов в последнее время используют различные полипептиды, такие как эндотоксины (В субъединица холерного токсина (СТВ), термолабильный эндотоксин сальмонеллы (LTB)), интерфероны и флагеллины. Например, в работе (Taylor et al., 2011) описано создание новой эффективной рекомбинантной вакцины против гриппа. При использовании флагеллина в качестве адьюванта уровень антител в крови пациентов вырос более чем в 10 раз. Кроме того, даже в дозе 5 мкг вакцина показала свою эффективность для пожилых людей (опытная группа со средним возрастом 71 год). До применения флагеллина пожилые люди слабо реагировали на вакцинацию и заболевали гриппом. Таким образом, продемонстрировано, что флагеллин обладает потенциалом для стимулирования врожденного и приобретенного иммунитета, причем формирует гуморальный и клеточный иммунный ответы при вакцинации (Mizel, Bates, 2010; Skountzou et al., 2010; Girard et al., 2011).

Флагеллин G (flagG) из *Salmonella typhi*, используемый нами как адьювант при создании кандидатной вакцины против клещевого энцефалита, входит в состав жгутиков бактерий, где выполняет структурную функцию. При попадании в организм теплокровных флагеллин взаимодей-

ствует с toll-like-рецептором (TLR5) клеток врожденной иммунной системы, что приводит к развитию воспаления как защитной реакции организма со стороны врожденного иммунитета и дальнейшему формированию специфического (адаптивного) иммунитета. Благодаря этому свойству флагеллин рассматривается как адъювант, т.е. усилитель иммунных ответов организма на введение чужеродного белка. Предложенный нами подход к созданию новых субъединичных вакцин против клещевого энцефалита предполагает объединение нескольких компонентов в одном полипептидном рекомбинантном белке: flagG, соединенный «мостиком» из трех аминокислот с protE, а также включение полигистидинового тракта на N-конце для улучшения эффективности выделения и очистки рекомбинантного белка. Такого рода вакцины потенциально должны минимизировать негативные эффекты, связанные с повышением температуры после вакцинации и развитием неспецифических воспалительных процессов в месте введения, а также усиливать иммунный ответ организма человека при меньшей дозе препарата.

Гликопротеин E входит в состав вириона вируса клещевого энцефалита и является единственным экспонируемым на его поверхности белком (Mandl et al., 1988). В своем составе гликопротеин E имеет три основных домена, причем домен III обеспечивает индукцию вируснейтрализующих антител (Heinz, Stiasny, 2012). Иммунизация даже одним этим доменом обеспечивает защиту животных от летальной инфекции (Ershova et al., 2016). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что антигенная структура рекомбинантного protE-белка может быть изменена под влиянием флагеллинового домена, что в свою очередь может привести к недоступности некоторых антигенных детерминант. Тем не менее принципиально важные районы в области пептида слияния и домена III представлены на поверхности гибридного белка. Это должно обеспечить формирование нейтрализующих антител, а наличие полной аминокислотной последовательности белка E в составе гибридного белка также индуцирует формирование Т-клеточного иммунного ответа. Полученные результаты показывают, что гибридный белок flagG-protE имеет хорошие перспективы для использования в качестве кандидатной вакцины против вируса клещевого энцефалита.

Таким образом, сконструирован рекомбинантный ген, кодирующий флагеллин *G. S. typhi*, слитый с геном гликопротеина E (protE) ВКЭ. Между генами заложен «шарнир» из трех аминокислотных остатков и полигистидиновый тракт для аффинной очистки на колонке Ni-NTA. С помощью панели МКА показана сохранность основных антигенных детерминант в составе гибридного белка. Можно ожидать усиления иммуногенных характеристик рекомбинантного белка flagG-protE за счет введения адъюванта. Кроме того, мы предполагаем, что белки с большой молекулярной массой обладают повышенной иммунностью, что должно повысить эффективность потенциальной вакцины против ВКЭ. Появление нового поколения вакцин против КЭ с более высоким уровнем безопасности и иммуногенности позволит усовершенствовать вакцинопрофилактику населения от клещевого энцефалита.

## Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project 0324-2016-008 “Genetic Foundations of Biotechnologies and Bioinformatics”.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Amicizia D., Domnich A., Panatto D., Lai P.L., Cristina M.L., Avio U., Gasparini R. Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Europe and its prevention by available vaccines. Hum. Vaccin. Immunother. 2013;9(5):1163-1171. DOI 10.4161/hv.23802.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976;72:248-254. DOI 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Charrel R.N., Attoui H., Butenko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Frolova T.V., Gould E.A., Gritsun T.S., Heinz F.X., Labuda M., Lashkevich V.A., Loktev V., Lundkvist A., Lvov D.V., Mandl C.W., Niedrig M., Papa A., Petrov V.S., Plyusnin A., Randolph S., Süß J., Zlobin V.I., de Lamballerie X. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. Clin. Microbiol. Infect. 2004;10:1040-1055. DOI 10.1111/j.1469-0691.2004.01022.x.
- Engler C., Kandzia R., Marillonnet S.A. One pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. PLoS ONE. 2008; 3(11):e3647. DOI 10.1371/journal.pone.0003647.
- Ershova A.S., Gra O.A., Lyaschuk A.M., Grunina T.M., Tkachuk A.P., Bartov M.S., Savina D.M., Sergienko O.V., Galushkina Z.M., Gudov V.P., Kozlovskaya L.I., Kholodilov I.S., Gmyl L.V., Karganova G.G., Lunin V.G., Karyagina A.S., Gintsburg A.L. Recombinant domains III of Tick-Borne Encephalitis Virus envelope protein in combination with dextran and CpGs induce immune response and partial protectiveness against TBE virus infection in mice. BMC Infect. Dis. 2016;16(1):544. DOI 10.1186/s12879-016-1884-5.
- Gaidamovich S.Ya., Loktev V.B., Lavrova N.A., Maksyutov A.Z., Mel'nikova E.E., Pereboev A.V., Protopopova E.V., Razumov I.A., Sveshnikova N.A., Khusainova A.D. Monoclonal antibodies cross-reacting with the tick-borne encephalitis virus and with the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. Voprosy virusologii = Problems of Virology. 1990;35(3):221-225. (in Russian)
- Girard A., Saron W., Bergeron-Sandoval L.P., Sarhan F., Archambault D. Flagellin produced in plants is a potent adjuvant for oral immunization. Vaccine. 2011;29(38):6695-6703. DOI 10.1016/j.vaccine.2011.06.092.
- Glover D.M. DNA Cloning. A Practical Approach, vols. 1, 2. Oxford: IRL Press Publ., 1985. [Russ. ed.: Glover D.M., Klonirovanie DNK. Metody. Moscow: Mir Publ., 1988. (in Russian)].
- Glushkova L.I., Korabel'nikov I.V., Egorova Iu.I. Occurrence of *Ixodes persulcatus* P. Sch. in the southern and central Republic of Komi. Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitological Diseases. 2011;3:48-50. (in Russian)
- Gosudarstvennyy doklad “O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Sverdlovskoy oblasti v 2016 godu” [State report “On the state of the sanitary and epidemiological welfare of the population in the Sverdlovsk oblast in 2016”]. Yekaterinburg, 2017. (www.66.rospotrebnadzor.ru). (in Russian)
- Grard G., Moureau G., Charrel R.N., Lemasson J.J., Gonzalez J.P., Galilian P., Gritsun T.S., Holmes E.C., Gould E.A., de Lamballerie X. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. Virology. 2007; 361(1):80-92. DOI 10.1016/j.virol.2006.09.015.
- Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. Tick-borne encephalitis. Antiviral Res. 2003;57:129-146. DOI 10.1016/S0166-3542(02)00206-1.
- Heinz F.X., Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. J. Clin. Virol. 2012;55(4):289-295. Epub 2012; Sep 21. DOI 10.1016/j.jcv.2012.08.024.

- Heinz F.X., Stiasny K., Holzmann H., Grgic-Vitek M., Kriz B., Essl A., Kundi M. Vaccination and tick-borne encephalitis, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2013;19(1):69-76. DOI 10.3201/eid1901.120458.
- Korenberg E.I., Kovalevskii Y.V. Main features of tick-borne encephalitis eco-epidemiology in Russia. *Zentralblatt Bakteriologie*. 1999; 289(5-7):525-539. DOI 10.1016/S0934-8840(99)80006-1.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.
- Leonova G.N., Ternovoi V.A., Pavlenko E.V., Maistrovskaya O.S., Protopopova E.V., Loktev V.B. Evaluation of vaccine Encepur® Adult for induction human neutralizing antibodies against recent Far Eastern subtype strains of tick-borne encephalitis virus. *Vaccine*. 2007;25(5):895-901. DOI 10.1016/j.vaccine.2006.09.014.
- Loktev V.B. Taxonomy of flaviviruses and their genetic diversity. *In: Infektsii, peredavaemye kleshchami v Sibirskom regione. (Red. Vlasova V.V., Repina V.E.) [Vlasova V.V., Repina V.E. (Eds). Infections Transmitted by Ticks in the Siberian Region]. Novosibirsk: SB RAS Publ., 2011;257-279. (in Russian)*
- Mandl C.W., Guirakhoo F., Holzmann H., Heinz F.X., Kunz Ch. Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. *J. Virol.* 1988; 63:564-571. DOI 10.1016/0166-0934(90)90042-E.
- McDonald W.F., Huleatt J.W., Foellmer H.G., Hewitt D., Tang J., Desai P., Price A., Jacobs A., Takahashi V.N., Huang Y., Nakaar V., Alexopoulos L., Fikrig E., Powell T.J. A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. *J. Infect. Dis.* 2007;195(11):1607-1617.
- Mikryukova T.P., Chausov E.V., Konovalova S.N., Kononova Yu.V., Protopopova E.V., Kartashov M.Yu., Ternovoy V.A., Glushkova L.I., Korabel'nikov I.V., Egorova Yu.I., Loktev V.B. Genetic diversity of the tick-borne encephalitis virus in *Ixodes persulcatus* ticks in northeastern European Russia. *Parazitologiya = Parasitology*. 2014;48(2):131-149. (in Russian)
- Mizel S.B., Bates J.T. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J. Immunol.* 2010;185(10):5677-5682. DOI 10.4049/jimmunol.1002156.
- Morozova O.V., Bakhvalova V.N., Matveyev L.E., Shevtsova A.S., Isaeva E.I., Zlobin V.I., Protopopova E.V., Seligman S. Antigenic and immunogenic properties of multiple antigenic peptides including the flavivirus fusion peptide. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2009;6(49):44-50. (in Russian)
- Morozova O.V., Bakhvalova V.N., Potapova O.F., Grishechkin A.E., Isaeva E.I., Aldarov K.V., Klinov D.V., Vorovich M.F. Evaluation of immune response and protective effect of four vaccines against the tick-borne encephalitis virus. *Vaccine*. 2014;32(25):3101-3106. DOI 10.1016/j.vaccine.2014.02.046.
- Protopopova E.V., Khusainova A.D., Konovalova S.N., Loktev V.B. Preparation and study of properties of anti-idiotypic antibodies, carrying hemagglutinating paratopes of tick-borne encephalitis virus on their surface. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 1996; 41(2):50-53. (in Russian)
- Razumov I.A., Agapov E.V., Pereboyev A.V., Protopopova E.V., Lebedeva S.D., Loktev V.B. Antigenic structure of the Venezuelan equine encephalomyelitis E2 glycoprotein as analyzed with rat monoclonal antibodies. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 1991;36(1): 34-37. (in Russian)
- Romanova L.Yu., Gmyl' L.V., Loktev V.B., Protopopova E.V., Dzhibanyan T.I., Lashkevich V.A., Karganova G.G. Change in the antigenic structure of surface glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus during its adaptation to ticks and mammals. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2006;51(6):31-34. (in Russian)
- Skountzou I., Martin M.P., Wang B., Ye L., Koutsouanos D., Weldon W., Jacob J., Compans R.W. *Salmonella* flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. *Vaccine*. 2010;28(24):4103-4112. DOI 10.1016/j.vaccine.2009.07.058.
- Taylor D., Treanor J., Strout C., Johnson C., Fitzgerald T., Kavita U., Ozer K., Tussey L., Shaw A. Induction of a potent immune response in the elderly using the TLR-5 agonist, flagellin, with a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125, STF2. HA1 SI). *Vaccine*. 2011;29:4897-4902. DOI 10.1016/j.vaccine.2011.05.001.
- Tokarevich N.K., Tronin A.A., Blinova O.V., Buzinov R.V., Boltenev V.P., Yurasova E.D., Nurse J. The impact of climate change on the expansion of *Ixodes persulcatus* habitat and the incidence of tick-borne encephalitis in the north of European Russia. *Glob. Health Action*. 2011;4:8448.
- Yoshii K., Song J.Y., Park S.B., Yang J., Schmitt H.J. Tick-borne encephalitis in Japan, Republic of Korea and China. *Emerg. Microbes Infect.* 2017;6(9):e82. DOI 10.1038/emi.2017.69.
- Zil'ber L.A. Epidemic spring-summer tick-borne encephalitis. *Sovremennaya meditsina = Modern Medicine*. 1939;23:11-15. (in Russian)
- Zlobin V.I. Tick-borne encephalitis in the Russian Federation: etiology, epidemiology and prevention strategy. *Terra Medica*. 2010;2:13-21. (in Russian)