

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-355

**УСИЛЕНИЕ ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ ЗА СЧЕТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ  
СПЕЙСЕРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В СОСТАВЕ ПОЛИЭПИТОПНЫХ  
Т-КЛЕТОЧНЫХ ИММУНОГЕНОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА \***

**ENHANCEMENT OF IMMUNOGENIC PROPERTIES  
BY USING SPACER SEQUENCES AS PART OF POLYPEPTIDE  
T-CELL IMMUNOGENS OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS**

Е. В. Тигеева, Е. В. Шабурова, Д. Н. Кисаков, М. Б. Боргоякова, Е. В. Старостина,  
В. А. Яковлев, Л. А. Кисакова, Н. Б. Рудометова, А. П. Рудометов, Л. И. Карпенко

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

E. V. Tigeeva, E. V. Shaburova, D. N. Kisakov, M. B. Borgoyakova, E. V. Starostina,  
V. A. Yakovlev, L. A. Kisakova, N. B. Rudometova, A. P. Rudometov, L. I. Karpenko

*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*

✉ lena.tigeeva@gmail.com

**Аннотация**

В работе представлены результаты сравнительного исследования двух Т-клеточных полиэпитопных иммуногенов AG1 и AG4, кодирующих цитотоксические и Т-хэлперные эпитопы из белков NS1, NS3, NS5 и Е вируса клещевого энцефалита. Показано, что включение аланиновых спейсеров в конструкцию AG1, спроектированную с помощью PolyCTLDesigner, позволило повысить ее иммуногенность.

**Abstract**

This work provides the results of a comparative study of two T-cell polyepitope immunogens AG1 and AG4 encoding cytotoxic and T-helper epitopes from NS1, NS3, NS5 and E proteins of tick-borne encephalitis virus. The integration of alanine spacers into the AG1 construct designed with PolyCTLDesigner was shown to increase its immunogenicity.

Лицензированные вакцины против вируса клещевого энцефалита (КЭ) на основе инактивированного вируса нацелены на активацию В-клеточного ответа против вируса. Несмотря на высокую иммуногенность и эффективность, недостатком таких вакцин является необходимость постоянной ревакцинации в целях поддержания защитного иммунитета. Одной из причин этого явления может быть недостаточное разнообразие реакций Т-клеточного иммунного ответа.

В последние годы концепция создания искусственных полиэпитопных иммуногенов все чаще применяется при разработке вакцин против различных вирусных инфекций. Полиэпитопные иммуногены представляют собой относительно новую технологию создания вакцин, основанную на применении современных методов рационального дизайна при конструировании последовательностей, включающих иммунодоминантные Т-клеточные эпитопы. Такой подход позволяет добиться высокоспецифичного Т-клеточного иммунного ответа на тот или иной антиген.

На данный момент вопрос о влиянии на иммуногенность искусственных антигенов различных факторов остается малоизученным. Так, одной из проблем дизайна полиэпитопных вакцин является подбор линкеров, соединяющих разные пептиды друг с другом.

Целью данной работы стало сравнительное исследование двух экспериментальных ДНК-вакцин, кодирующих полиэпитопные иммуногены AG1 и AG4.

Ранее в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» были спроектированы Т-клеточные полиэпитопные иммуногены AG1 и AG4, включающие Т-клеточные эпитопы вируса КЭ, в состав которых входят цитотоксические и Т-хэлперные эпитопы из белков NS1, NS3, NS5 и Е ВКЭ. При дизайне AG1 были использованы аланиновые спейсеры, которые подбирались на основе данных программы PolyCTLDesigner. Выбор последовательности был обусловлен тем, что наличие аланина на N-конце спейсера благоприятно сказывается на процессинге фрагмента иммунопротеазами. Для AG4 спейсеры были полностью исключены из конструкции иммуногена. Полученные

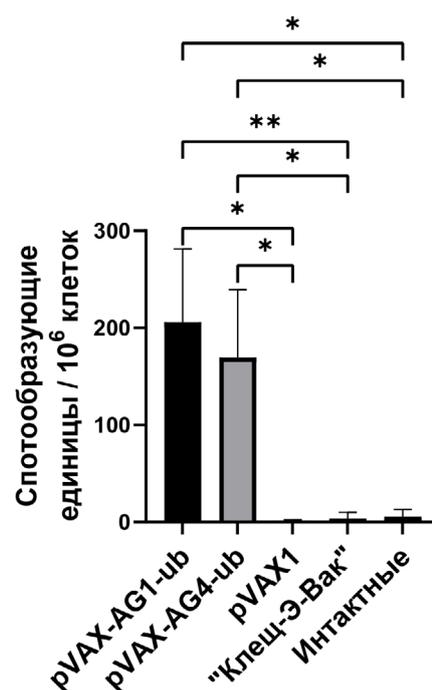
\* Исследование было выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

конструкции были клонированы в составе плазмидного вектора pVAX1, соответствующие плазмиды были названы pVAX-AG1-ub и pVAX-AG4-ub.

Для оценки иммуногенности полученных ДНК-вакцинных конструкций проводили иммунизацию мышей линии BALB/c. Иммунизацию мышей проводили дважды на 0 и 21 дни. Первой группе животных вводили в/м 100 мкг плазмиды pVAX-AG1-ub в 50 мкл PBS с последующей электропорацией; второй группе животных вводили в/м 100 мкг плазмиды pVAX-AG4-ub в 50 мкл PBS с последующей электропорацией; третьей группе — 100 мкг pVAX1 в 50 мкл PBS с последующей электропорацией; четвертой группе вводили внутривенно 0,5 мл вакцины Клещ-Э-Вак (ФГУП «ПИПВЭ им. М. П. Чумакова» РАМН). Эксперименты с животными проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с протоколами, утвержденными биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (номер разрешения: ГНЦ ВБ «Вектор»/02-03.2023, Протокол БЭК № 2 от 03.04.2023).

Анализ Т-клеточного иммунного ответа с помощью метода IFN-γ-ELISpot проводили на 14 сутки после второй иммунизации. В контрольных группах животных, иммунизированных вакциной «Клещ-Э-Вак» и pVAX1, клеточный ответ был на уровне фона (см. рисунок). Было показано, что наибольшее количество спленоцитов, продуцирующих IFN-γ в ответ на специфическую стимуляцию пулом пептидов из белков ВКЭ, зарегистрировано в группе мышей, иммунизированных pVAX-AG1-ub, по сравнению с группой, иммунизированной pVAX-AG4-ub. Хотя такое различие не является статистически достоверным, подобная тенденция сохранялась в повторных экспериментах.

Таким образом, полученные ДНК-вакцинные конструкции pVAX-AG4-ub и pVAX-AG1-ub индуцируют формирование вирус-специфического Т-клеточного ответа. При этом pVAX-AG1-ub индуцирует более высокий уровень Т-клеточного ответа, чем pVAX-AG4-ub. Включение аланиновых спейсеров в конструкции AG1, спроектированную с помощью PolyCTLDesigner, позволило повысить ее иммуногенность, по-видимому, за счет лучшего процессинга и презентации эпитопов.



Количество спленоцитов, экспрессирующих IFNγ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов, определенное методом ELISpot. Различия между группами определяли с использованием непараметрического критерия Краскела — Уоллеса (P-value \*\* — 0,01)