

Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

HCV prototipa vakcīna izveidota uz hepatīta B kora vīrusveidīgo daļiņu pamata



Autors: Marija Mihailova

Darba vadītāji: Prof. Pauls Pumpens, LBMC, Rīga, Latvija

Dr.Biol. Sergejs Viazovs, Virusoloģijas institūts,
Esenes Universitātes slimnīca, Esene, Vācija

Dr.Biol. Irina Sominska, LBMC, Rīga, Latvija

Konsultants: Prof. Mihaels Rogendorfs, Virusoloģijas institūts,
Esenes Universitātes klīnika, Esene, Vācija

Oponenti:



Publikāciju kopa

Bioloģijas fakultāte
Latvijas Universitāte
Rīga, 2007

Satura rādītājs

Darba anotācija	3
Darba aktualitāte	4
Darba mērķis	6
Ieskats HCV vakcīnu izstrādē	7
Īss metožu apraksts	9
Pamata DNS metodes	9
Rekombinantu plazmīdu ekspresija <i>E. coli</i> šūnās	9
Rekombinantu proteīnu attīrīšana	9
Poliakrilamīda gēla elektroforēze (SDS-PAGE), imunoblota analīze un imunodifūzija	9
HCV veidīgo daļiņu (HCV-LP) neitralizācijas analīze	10
Peļu imunizācija	10
ELISA un proliferācijas tests	10
Rezultātu pārskats	12
Himēro HBc/HCV proteīnu ekspresija un to raksturošana	12
6×His HCV proteīnu ekspresija	17
HBc/HCV VLPs un 6×His HCV proteīnu imunogenitātes novērtēšana	18
Secinājumi	25
Publikāciju saraksts	27
Pateicības	28
Literatūras saraksts	30
Oriģinālās publikācijas	37

Darba anotācija

Pateicoties unikālai telpiskai struktūrai un pašsavākšanās spējām, hepatīta B vīrusa kora (HBc) proteīns un tā C termināli saīsinātā forma tiek plaši izmantoti kā svešu epitopu un proteīnu fragmentu nesēji. Šajā pētījumā C termināli saīsinātie HBc ekspresijas vektori tika izmantoti dažādu hepatīta C vīrusa (HCV) proteīnu (kora, E2 un NS3) fragmentu eksponēšanai. HBc/HCV himēru proteīnu konstruēšanai tika izraudzītas divas galvenās pieejas: (1) svešu sekvenču insercijas HBc galvenajā imunodominantajā rajonā (MIR) un (2) izvēlēto secību sapludināšana ar HBc C galu. Visas izveidotās konstrukcijas inducēja relatīvi augstu rekombinanto proteīnu sintēzes līmeni *E.coli* šūnās, kaut gan ne visi himērie proteīni bija spējīgi pašsavākties vīrusveidīgajās daļiņās (VLPs). Tādējādi, HCV kora fragmenta aa 1-98 un hipervariablā rajona 1 (HVR1) tetramēra insercija MIR rajonā, kā arī HCV NS3 fragmenta aa 202-326 sapludināšana ar HBc C galu noveda pie nepilnvērtīgu kapsīdu un proteīnu agregātu veidošanās, norādot uz HCV fragmenta insercijas vietas nozīmi un svešu sekvenču ietekmi uz HBc kapsīdu struktūru. Lai pilnveidotu himērā proteīna imunogenitāti, konstrukcijā HBcCterm/core98 tika ieviestas divas modifikācijas: (i) RGD tripeptīda insercija HBc proteīna N galā un (ii) SPRRR ‘astes’ insercija HBc C galā. Tiešām, HBcCterm/core98 konstrukcija, kas saturēja RGD tripeptīdu, inducēja krietni augstāku anti-HBc antivielu titru un spēcīgāku anti-HBc proliferatīvo imūno atbildi nekā HBcCterm/core98 un HBcCterm/core98-SPRRR konstrukcijas, tādējādi liekot domāt par labāku proteīna uzņemšanu ar antigēnu prezentējošām šūnām. HBcCterm/HVR1tetramer VLPs izrādījās par visefektīvāko HBc/HCV imunogēnu no visām testētajām konstrukcijām. Tās spēja inducēt HCV specifisku imūno atbildi, kā humorālu, tā arī T šūnu proliferatīvo. Interesanti rezultāti tika iegūti ar HBcCterm/NS3/327-482 himēro proteīnu, jo tika sasniegta tikai humorāla HCV specifiska imūnā atbilde. HCV specifiskas T šūnu atbildes trūkums lika secināt par HBcCterm/NS3/327-482 konstrukcijas T šūnu neatkarīgās imūnās atbildes indukciju. Lai noteiktu anti-HVR1 tetramēra antivielu neitralizējošo potenciālu, ar HBcCterm/HVR1tetramer VLPs imunizēto peļu serumi tika izmantoti surogāta HCV „vīrusa neitralizācijas” testā. Eksperiments parādīja, ka imunizēto dzīvnieku serumi spēja inhibēt HCV-līdzīgu daļiņu (1a un 1b genotipu) saistīšanos ar Huh7 šūnām, parādot krosreaktivitātes HCV-neitralizējošās spējas. Iegūtie rezultāti demonstrē principiālu HBc atvasināto VLP izmantošanas iespēju jauna tipa HCV-specifisko imunogēnu izveidei. Šādu imunogēnu izveide balstās uz: (i) himēro daļiņu dizaina optimizāciju, (ii) mozaīkveida daļiņu izmantošanu, kas satur vairākus epitopus no dažādiem HCV proteīniem, un (iii) šo optimizēto konstrukciju spēju inducēt ne tikai humorālu, bet arī spēcīgu un plašu šūnu imūno atbildi pret vairākiem vīrusa epitopiem.

Darba aktualitāte

Tiek aprēķināts, ka 3% pasaules iedzīvotāju – vairāk kā 170 miljoni cilvēku- ir inficēti ar hepatīta C vīrusu (HCV). Lielākā daļa infekciju pāriet hroniskajā fāzē, ko nav iespējams izārstēt vairākumam pacientu, kas savukārt noved pie cirozes un hepatocelulārās karcinomas. Laika posmā no 2006.gada janvāra līdz 2006.gada decembrim Latvijā tika reģistrēti 1339 hroniskā hepatīta C gadījumi un 105 akūtā hepatīta C infekciju gadījumi (<http://www.sva.lv/epidemiologija/statistika/>). Hroniskā hepatīta C pacientu skaits bija pieaudzis par 30% salīdzinājumā ar 2005.gadu un par 76% - salīdzinājumā ar statistiskajiem datiem, kas tika iegūti pēdējo piecu gadu laikā (<http://www.sva.lv/epidemiologija/statistika/>). Pašreiz esošās medicīniskās ārstēšanas iespējas ir ierobežotas. Patiešām, hroniska HCV infekcija ir visbiežākais iemesls aknu pārstādīšanai. Neskatoties uz to, ka ar molekulārās bioloģijas metodēm vīrusu tika atklāts jau 15 gadus atpakaļ, kā arī tika noteikta tā genoma secība, mūsu zināšanas par vīrusu un aizsargmehānismu dabu ir niecīgas. Līdz šim zinātniekus aizkavēja šūnu kultūru sistēmas trūkums, kas neļāva producēt infekciozu vīrusu, kā arī ne primātu dzīvnieka modeļa trūkums. Šobrīd izveidojusies situācija skaidri parāda jaunu profilaktisku un terapeitisku pieeju nepieciešamību, kas spētu novērst tālāku HCV izplatību un nodrošinātu efektīvāku pretvīrusa terapiju cilvēkiem, kas cieš no hroniskā hepatīta C.

Tiek uzskatīts, ka efektīvai HCV vakcīnai jābūt spējīgai inducēt spēcīgu, ilgi darbojošos un krosreaktīvu humorālo imūno atbildi, kā arī multispecifisku šūnu imūno atbildi, kas iekļauj gan T helperu (T_H) limfocītus, gan citotoksiskos T limfocītus (CTL) (Neumann-Haefelin *et al.*, 2005; Rollier *et al.*, 2004; Bowen & Walker, 2005; Torresi *et al.*, 2004; Rehmann & Nascimbeni, 2005). Šādas vakcīnas izstrādes ceļā ir daudz grūtību. HCV infekcijas gaita un HCV mehānismi iedarbībā uz saimnieka organismu ir ļoti sarežģīti procesi, kas vēl līdz šim nav labi izprotami. Būtu precīzi jādefinē arī savstarpēji saistīto imunoloģisko faktoru sistēmas ietekme uz slimības gaitu vai neuzņemību pret to. Turklāt, HCV tiek raksturots ar augstu genoma sekvenču mainību un „kvazi sugu” izplatību inficētajā saimniekā. Retas un dārgas šimpanzes vēl joprojām ir vienīgais pieejamais dzīvnieka modelis HCV infekcijas pētījumiem. Neskatoties uz visām šīm grūtībām un ierobežojumiem, vērojams progress tika sasniegts pēdējo dažu gadu laikā, un tiek pētīti vairāki vakcīnu kandidāti. Starp tiem ir rekombinantu proteīnu subvienību vakcīna, peptīdu vakcīna, dzīva rekombinanta vakcīna, vīrusveidīgās daļiņas un DNS vakcīna (Torresi *et al.*, 2004; Houghton & Abrignani, 2005; Lechner *et al.*, 2002; Inchauspe & Feinstone, 2003; Encke *et al.*, 2005; Duenas-Carrera, 2004). Visas šīs pieejas ir daudzsološas, kaut gan katrai no tām ir dažas nepilnības un ierobežojumi, un to pielietošanu medicīniskajā praksē vēl ir nepieciešams noteikt. Visdrīzāk, efektīva nākotnes HCV vakcīna tiks balstīta uz diviem vai vairākiem imunogēniem, viens, no kuriem varētu būt multi epitopu vīrusveidīgās daļiņas (VLPs). Viens no daudzsološākajiem VLP kandidātiem ir himēras daļiņas uz hepatīta B vīrusa kora antigēna

(HBcAg) pamata. Galvenā strukturālā rekombinantu HBc daļiņu priekšrocība ir to pilnveidota imunogenitāte, veidojoties kovalentām saitēm starp B un T_H epitopiem, ka arī HBcAg spēja „uzvesties” gan kā T šūnu atkarīgam antigēnam, gan kā T šūnu neatkarīgam antigēnam. Rezultātā HBc daļiņas inducē augstus antivielu titrus un spēcīgu T šūnu proliferatīvu atbildi (Ulrich *et al.*, 1998; Pumpens & Grens, 2001). HBc daļiņu perspektīvas tika demonstrētas pavisam nesen veiksmīgajā klīniskajā pētījumā fāzē I malārijas vakcīnā, kas tika izveidota uz HBcAg platformas (Oliveira *et al.*, 2005).

Darba mērķis

Šis pētījums tika fokusēts uz HBc/HCV himēru vīrusveidīgu daļiņu konstrukciju specifiskas anti-HCV humorālās un šūnu imūnās atbildes iegūšanai pelēs. Lai sasniegtu šo mērķi, tika izvirzīti sekojoši uzdevumi:

- 1) Atbilstošu HCV proteīnu – kora, E2 un nestrukturālā proteīna 3 (NS3) – epitopu vai epitopu klasteru identifikācija.
- 2) Piemērotas ekspresijas sistēmas un attiecīga HBc vektora HCV determinanšu insercijai izvēle.
- 3) Attīrītu himēru HBc/HCV vīrusveidīgo daļiņu raksturošana.
- 4) HBc/HCV proteīnu imunogenitātes novērtēšana pelēs.
- 5) Tieši ekspresētu HCV proteīnu un attiecīgu HBc/HCV daļiņu imunogenitātes salīdzinošā analīze.

Ieskats HCV vakcīnu izstrādē

Kādu laiku atpakaļ efektīva vakcinācija pret HCV tika uzskatīta par attālu iespējamību. Trīs faktori bija tam par pamatu: augsta HCV spēja veicināt hronisku persistentu infekciju (Alter & Seeff, 2000); pierādījums, ka veselību atgūstošie slimnieki un šimpanzes, var tikt atkārtoti inficēti (Lai *et al.*, 1994); un vēlā ņemama šī, pozitīvi lādēta vienpavediena RNS, vīrusa ģenētiskā daudzveidība (Simmonds, 2004). Situācija šodien ir pozitīvāka divu iemeslu dēļ. Pirmkārt, tagad mēs zinām, ka spontāna vīrusa iznīcināšana notiek līdz pat 50% akūto infekciju gadījumos (Seeff, 2002), un, ka šī atbrīvošanās no vīrusa ir saistīta ar specifisku imūno atbildi pret vīrusu. Tādējādi, šādas imūnās atbildes atjaunošana ar atbilstošas vakcinācijas palīdzību, kļūst par reālu iespēju. Otrkārt, nesen tika iegūti skaidri pierādījumi par iedzimto imunitāti gan cilvēkos (Mehta *et al.*, 2002), gan šimpanzēs (Weiner *et al.*, 2001; Bassett *et al.*, 2001; Landorf *et al.*, 2004). (Šimpanze ir vienīgais pieejamais dzīvnieka modelis, un tām attīstās slimība tikai ar mērenām klīniskajām sekām.) Veselību atgūstošie slimnieki un šimpanzes vismaz ir daļēji pasargāti pret atkārtotu inficēšanos ar vīrusu. Ir svarīgi, ka aizsardzība pie atkārtotās inficēšanās parasti ir hroniskas persistentas infekcijas novēršanas līmenī, nevis akūtās saslimšanas novēršanas līmenī. Bet šo faktu būtu iespējams izmantot efektīvā profilaksē, jo cilvēkiem tieši hroniska persistenta HCV infekcijas daba galvenokārt tiek saistīta ar vīrusa patogenitāti (Alter & Seeff, 2000; Seeff, 2002). Neskatoties uz to, ka dažiem indivīdiem attīstās hroniska infekcija (Farci *et al.*, 1992), vairākumam tas nenotiek (Mehta *et al.*, 2002; Weiner *et al.*, 2001; Bassett *et al.*, 2001; Landorf *et al.*, 2004). Tas liecina, ka vismaz daļēji efektīvas pret HCV vakcīnas izstrāde ir izpildāma. Tiešām, ārkārtīgie vakcīnu efektivitātes dati, kas tika iegūti uz šimpanzes modeļa, norāda, ka vakcinētajos dzīvniekos ir iespējams kavēt infekcijas progresēšanu hroniskajā fāzē. Tikai pavisam nesen kļuva iespējams efektīvi audzēt HCV vīrusu šūnu kultūrā (Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005; Lindenbach *et al.*, 2005), un līdz ar to, vēl nav izvērtēta inaktivētas vai dzīvi novājinātas vakcīnas iespēja. Tādējādi vakcīnu pieejas iekļāvušas adjuvētas rekombinantas vīrusa polipeptīdu subvienības, mēģinot inducēt vīrusu neitralizējošās antivielas pret apvalka glikoproteīniem 1 un 2 (gpE1 and gpE2), kā arī inducēt MHC klases II restriktēto CD4⁺ T_H un MHC klases I restriktēto CD8⁺ CTL limfocītu atbildes uz šiem vai citiem vīrusa proteīniem. Abi T šūnu tipi spēj izdalīt pretvīrusa citokīnus tādus kā, interferons- γ (IFN- γ), un CD8⁺ CTL piemīt potenciāls nogalināt inficētās šūnas.

Samērā grūti ir inducēt CD8⁺ CTL izmantojot polipeptīdu subvienību vakcīnas, kaut gan noteikti adjuvanti to spēj (Polakos *et al.*, 2001; Pearse & Drane, 2005). Dažādas plazmīdu DNS vakcīnu formas arī tiek pētītas HCV specifiskas humorālās un celulārās imūnās atbildes inducēšanā pret iekodētiem antigēniem, kas tiek no jauna sintezēti transficēto šūnu citosolā un var būt efektīvi CD8⁺ CTL veidošanā. DNS vakcīnas satur arī imunostimulatoros deoksicitozīna deoksiguanozīna (CpG) motīvus, kas spēj aktivēt antigēnu prezentējošas dendrītu šūnas

(Houghton & Abrignani, 2005). Tas novestu pie iedzimtās imūnās atbildes (tāda kā 1.tipa interferonu sintēze un naturālās galinātājšūnas (NK)) stimulācijas, kā arī adaptīvās B un T šūnu atbildes uz vakcīnas antigēniem. Dažādi dzīvi novājināti vai defektīvi vīrusu vai baktēriju vektori, kas ekspresē HCV gēnus, arī tiek pētīti, jo vakcīnas imunogenitāte var tikt uzlabota ar efektīvāku HCV antigēnu ekspresiju un nogādāšanu. Dažos gadījumos tas var iekļaut antigēnu prezentējošu šūnu mērķēšanu. Atšķirīgu iniciēšanas/stimulēšanas imunizācijas paņēmieni pieeja arī tiek izmantota vakcīnas imunogenitātes un potences optimizācijai (Houghton & Abrignani, 2005). Šobrīd ļoti daudzi pieņem, ka HBc nesējs ir spējīgs nodrošināt augstu svešu B un T šūnu epitopu imunoigenitāti (Ulrich *et al.*, 1998; Milich *et al.*, 1995; Pumpens *et al.*, 1995; Schodel *et al.*, 1996; Pumpens & Grens, 1999; Murray & Shiau, 1999). Papildus tādai HBc nesēja daļas īpašībai, kā T šūnu palīdzības nodrošināšana, HBc kapsīda kalpo par starpnieku T šūnu neatkarīgās humorālās imūnās atbildes veidošanai pret svešajiem epitopiem, pateicoties daudziem epitopu atkārtojumiem un atbilstošai epitopu atrašanās vietai (Fehr *et al.*, 1998).

Jau iepriekš tika veikti vairāki eksperimenti ar HCV proteīnu fragmentu inserciju HBc vektoros, bet šo pētījumu mērķis bija citāds. HCV kora proteīna insercijas C galā demonstrēja ārkārtīgu HBc daļiņas ietilpību kā VLP nesēja: 559 aa gara insercija netraucēja himēru savākšanos, un pat 741 aa gara insercija tika veiksmīgi ekspresēta, zināmā mērā pieļaujot himēru savākšanos (Yoshikawa *et al.*, 1993). Ar HBc C galu sapludinātās HCV kora (Claeys *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1999) un NS3 (Claeys *et al.*, 1995) proteīna sekvences tika veiksmīgi izmantotas HCV specifisku antivielu noteikšanai fermentatīvajās imunoloģiskajās reakcijās.

Ļoti svarīga un praktiska HBc modeļa priekšrocība ir tā, ka himēros HBc atvasinājumus ir viegli attīrīt ar gēlfiltrācijas vai saharozes gradienta centrifugēšanas palīdzību, pateicoties to strukturētai dabai (Pumpens & Grens, 2001). C gala saīsinātie varianti var tikt pakļauti disociācijai ar turpmāko reasociācijas soli, lai atbrīvotos no iekšējiem piejaukumiem un iegūtu no nukleīnskābes brīvus paraugus. Īpašs HBc atvasinājumu attīrīšanas protokols vakcīnas kvalitātes līmenī tika izstrādāts, pievienojot sešu histidīnu 'asti' HBc C termināli saīsinātajam proteīnam (Wizemann & von Brunn, 1999). No otras puses, pilna garuma HBc himēru atvasinājumu spēja kontrolēti iepakot nukleīnskābi var tikt izmantota tālākai šī nesēja izmantošanai gēnu terapijas eksperimentos (Pumpens & Grens, 2001).

Īss metožu apraksts

Pamata DNS metodes

Eksperimenti ar DNS tika veikti izmantojot standarta procedūras (Sambrook *et al.*, 1989). Polimerāzes ķēdes, DNS restrikcijas un ligēšanas reakciju apstākļi tika izvēlēti pēc attiecīga fermenta ražotāja (Fermentas) ieteikuma. DNS mutaģenēzes procedūra tika izpildīta atbilstoši kita ražotāja (Stratagene) protokolam. *Escherichia coli* (*E. coli*) celms XL1-Blue ($F'::Tn10(Tet^r)proA^+B^+ lacI^q \Delta(lacZ)M15 / recA1 endA1gyrA96 (Nal^r) thi-1 hsdR17 (r_k^-m_k^-) glnV44 relA1 lac$)) tika izmantots plazmīdu klonēšanai un pavairošanai. Katras plazmīdas detalizētu aprakstu var atrast individuālajā publikācijā.

Rekombinantu plazmīdu ekspresija *E.coli* šūnās

Rekombinantu plazmīdu ekspresija himēru HBc/HCV vīrusveidīgu daļiņu iegūšanai tika veikta pēc jau publicēta protokola (Borisova *et al.*, 1999; Konig *et al.*, 1998). Rekombinantu plazmīdu ekspresija histidīna sapludinātu (6×His) HCV proteīnu iegūšanai tika veikta atbilstoši pQE-60 vektora ražotāja (Qiagen) protokolam. *E. coli* celmi K802 ($F'e14^- (McrA^-) metB1 lacY1$ or $\Delta lac(l-Y)6 galK2 galT22 glnV44 hsdR2 (r_k^-m_k^+) mcrB$), JM109 ($F' traD36 proA^+B^+ lacI^q \Delta(lacZ)M15 / e14^- (McrA^-) \Delta(lac-proAB) endA1 gyrA96 (Nal^r) thi-1 hsdR17(r_k^-m_k^+) glnV44 relA1 recA1$) un GI698 ($F' \lambda^- lacI^q lacPL8 ampC::P_{trp} cI mcrA mcrB INV(rnnD-rnnE)$) tika izmantoti pētījumā konstruēto HBc/HCV plazmīdu ekspresijai. *E. coli* celms JM109 tika izmantots histidīna sapludinātu HCV proteīnu ekspresijai.

Rekombinantu proteīnu attīrīšana

HBc/HCV proteīnu paraugu iegūšanai priekš peļu imunizācijas tika izmantota divu proteīnu attīrīšanas metožu (gēlfiltrācija un centrifugēšana saharozes gradientā) kombinācija. Detalizētāku aprakstu skatīt attiecīgajā publikācijā.

6×His HCV proteīnu attīrīšana tika veikta izmantojot metālu afīno hromatogrāfiju uz niķeļa nitrilotrietiķskābes (Ni-NTA) agarozes un 6M guanidīnhidrohlorīda līzes buferi atbilstoši proteīnu attīrīšanas protokolam denaturējošos apstākļos (Qiagen).

Poliakrilamīda gēla elektroforēze (SDS-PAGE), imunoblota analīze un imunodifūzija

SDS-PAGE analīzei attīrītie proteīnu preparāti (5 µg uz katru gēla joslu) tika sajaukti ar SDS gēla elektroforēzes paraugu buferi, kas saturēja 2% SDS un 5% β-merkaptotanolu, un sildīti 10 min 100°C. Proteīni tika sadalīti 15% SDS poliakrilamīda gēlā vertikālajā elektroforēzes kamerās (Bio-Rad). Imunoblota analīze tika veikta kā aprakstīts iepriekš (Towbin *et al.*, 1992). Imunodifūzija tika veikta 0.8% agarozes gēlā PBS buferī. Poliklonālās cūku anti-HBc antivielas tika pievienotas centrālajai gēla šūniņai. Dažādi HBc/HCV attīrītie himērie

proteīni un kontroles paraugi: natīvais pilna garuma HBcAg un saīsinātais HBc proteīns, tika pievienoti gēla perifērijas šūniņām ekvimolārajos daudzumos. Pēc 48 h inkubācijas agarozes gēls tika nokrāsots ar etīdija bromīdu, lai detektētu nukleīnskābes iepakojanos himērajās vīrusveidīgajās daļiņās. Pēc tam gēls tika izžāvēts un nokrāsots ar *Coomassie Brilliant blue R250* krāsu.

HCV veidīgo daļiņu (HCV-LP) neitralizācijas analīze

Serumi no dzīvniekiem, kas tika imunizēti ar HBc/HVR1tetramer daļiņām, tika izmantoti HCV-LP neitralizācijas testā (Steinmann *et al.*, 2004). Īsumā, HCV-LPs (sastāv no E1/E2 proteīniem, iegūtas izmantojot bakulovīrusa ekspresijas sistēmu kukaiņu šūnās, 1a vai 1b genotipa, atbilst aptuveni 0.25 µg HCV-LP E2/ml) tika inkubētas ar imunizēto dzīvnieku serumu vai kontroles seruma vairākiem atšķaidījumiem 1 h 37 °C. HCV-LP/seruma kompleksi tika pievienoti HuH-7 šūnām (1.5×10^5 šūnu uz bedrīti) un inkubēti 1 h 4°C. Pēc mazgāšanas ar PBS, ar šūnām saistīties HCV-LP E2 daudzums tika novērtēts, izmantojot plūsmas citometriju ar monoklonālajām šimpanzes anti-HCV E2 antivielām 49F3. Paralēli tika veikta HCV-LP saistīšanās inhibīcija ar monoklonālajām anti-HCV E2 antivielām AP33 (50 µg/ml) (pozitīvā kontrole). HCV-LP saistīšanās PBS klātbūtnē = 100%.

Peļu imunizācija

Peļu mātītes BALB/c (H-2^d) tika turētas standarta patogēnu brīvajos apstākļos Esenes Universitātes Centrālajā dzīvnieku laboratorijā Vācijā. Astoņas peļu grupas, pa sešām pelēm katra, tika izmantotas imunizācijā ar himērajām HBc/HCV VLPs un rekombinantajiem 6×His HCV proteīniem. Detalizētāku aprakstu skatīt atbilstošajā publikācijā.

ELISA un proliferācijas tests

Tiešā ELISA metode tika izmantota seruma antivielu noteikšanai imunizētajos dzīvniekos. Šim nolūkam, 96 šūnu plates (PolySorp, Nunc) tika pārklātas ar attīrītajiem rekombinantajiem core98/6×His, NS3/202-482/6×His, 6×His/HVR1tetramer proteīniem vai natīvajām HBcAg daļiņām koncentrācijā 10 µg/ml. Plašu šūniņas tika bloķētas ar 5% teļa embrija serumu (FCS). Imunoplates, pārklātās ar core98/6×His, tika izmantotas anti-HCV kora antivielu noteikšanai, imunoplates, pārklātās ar NS3/202-482/6×His, tika izmantotas anti-HCV NS3 antivielu detektēšanai, imunoplates, pārklātās ar 6×His/HVR1tetramer proteīnu, tika izmantotas anti-HCV HVR1tetramer antivielu noteikšanai, un plates, pārklātās ar HBcAg, tika izmantotas anti-HBc antivielu detektēšanai ar HBc/HCV VLPs imunizēto dzīvnieku serumos. Bloķētās plates tika inkubētas 1 h 37⁰C ar imunizēto dzīvnieku serumu sērijveida atšķaidījumiem vai kontroles dzīvnieku serumiem. Kopēja antivielu titra noteikšanai plates tālāk tika inkubētas 1 h 37⁰C ar HRP konjugētām anti-peļu IgG antivielām (Sigma). Antivielu IgG apakšklašu titru noteikšanai

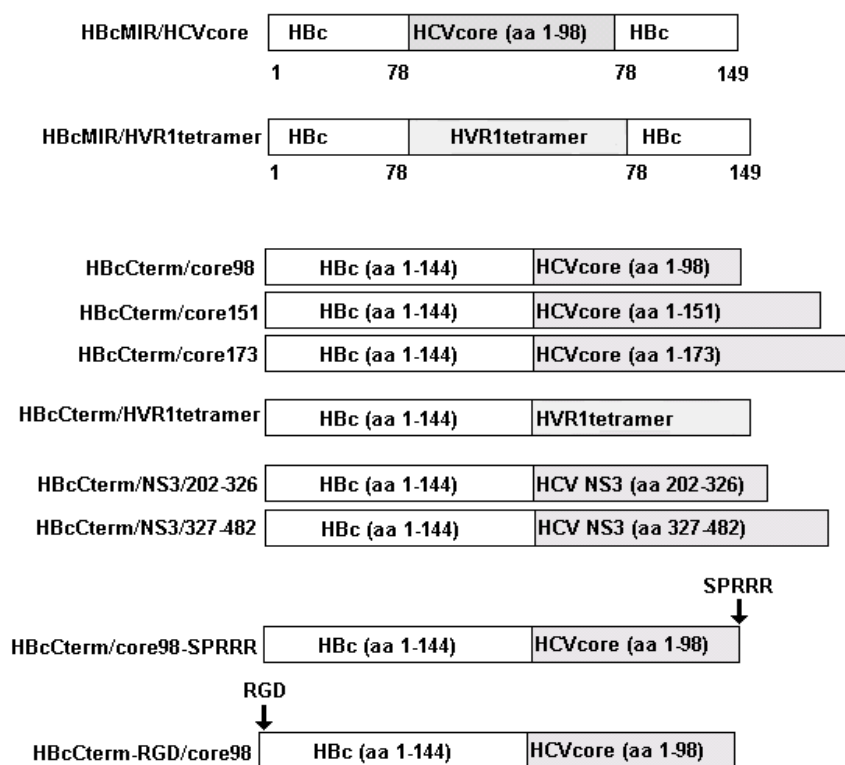
plates tika inkubētas 1 h 37⁰C ar HRP konjugētām anti-peļu IgG1 vai IgG2a sekundārajām antivielām (BD Pharmingen). Plates tika attīstītas ar o-fenilēndiamīnu (Sigma), un optiskais blīvums tika nolasīts uz 492 nm viļņa garuma.

Proliferācijas testam liesas šūnas, 1×10^6 šūnas/ml, no imunizētajiem dzīvniekiem vai kontroles dzīvniekiem tika audzētas 37⁰C trijos atkārtojumos 96 šūniņu platēs ar plakanu dibenu RPMI 1640 barotnē (PAA Laboratories) ar 10% FCS, 100 vienības/ml penicilīnu un 100 µg/ml streptomicīnu. Šūnas tika stimulētas ar 5 µg/ml konkanavalīna A, rekombinantu core98/6×His, NS3/202-482/6×His, 6×His/HVR1tetramer un natīvajām HBc daļiņām. Ceturtajā dienā pēc stimulācijas tika pievienots ³H-timidīns (1 µCi uz šūniņu). Šūnas tika inkubētas papildus 24 h, un pēc tam tika izmērīta ³H-timidīna inkorporācija DNS molekulās. Stimulācijas indekss (SI) tika aprēķināts kā vidējais cpm, kas tika nomērīts pēc stimulācijas ar antigēnu, izdalīts ar vidējo cpm, kas tika nolasīts šūnām inkubētajām tikai ar barotni. SI >3 tika uzskatīts par pozitīvu rezultātu.

Rezultātu pārskats

Himēro HBc/HCV proteīnu ekspresija un to raksturošana

Mēs bijām ieinteresēti konstruēt himēras HBc daļiņas ar dažādiem HCV proteīnu epitopiem. Par sākumpunktu mūsu pētījumiem bija agrākajos eksperimentos iegūtie pozitīvie rezultāti HCV proteīnu fragmentu ekspresijā kā HBcAg sapludinātu proteīnu, un šo himēro konstrukciju izmantošana diagnostikas mērķiem (Yoshikawa *et al.*, 1993; Claeys *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1999). Lai atrisinātu šo jautājumu, mēs izvēlējāmies trīs hepatīta C vīrusa proteīnus: koru, apvalka proteīnu 2 (E2) un nestrukturālo proteīnu 3 (NS3). Mūsu izvēle balstījās uz sekojošajām atziņām: (1) antivielas pret HCV koru slimības gaitā parādās pirmās salīdzinājumā ar antivielām pret citiem HCV proteīniem (Van der Poel *et al.*, 1991); (2) kors ir viskonservatīvākais HCV proteīns, pēc kura nāk konservatīvās secības NS3 un NS5 proteīnos (Okamoto *et al.*, 1992); antivielas pret apvalka proteīniem ir pirmie kandidāti uz vīrusa neitralizējošo antivielu statusu; (4) E2 proteīna hipervariablais rajons 1 (HVR1) satur ne tikai B šūnu epitopus, bet arī T šūnu epitopus; (5) tika parādīts, ka T helperu atbilde uz NS3 epitopiem ir saistīta ar vīrusa iznīcināšanu akūtajā hepatīta C infekcijā; un (6) visnozīmīgākie NS3 proteīna T



1.attēls. Pētījumā izmantoto himero HBc/HCV konstrukciju shematisks attēlojums.

helperu epitopi neatšķiras vai parāda tikai dažu aminoskābju atšķirību starp HCV genotipiem (Diepolder *et al.*, 1998).

Mūsu pētījums tika fokusēts uz HCV genotipu 1b, jo genotips 1 ir plaši izplatīts (tieši genotips 1b dominē Latvijā), kā arī tika ziņots, ka tas ir saistīts ar augstāku RNS līmeni,

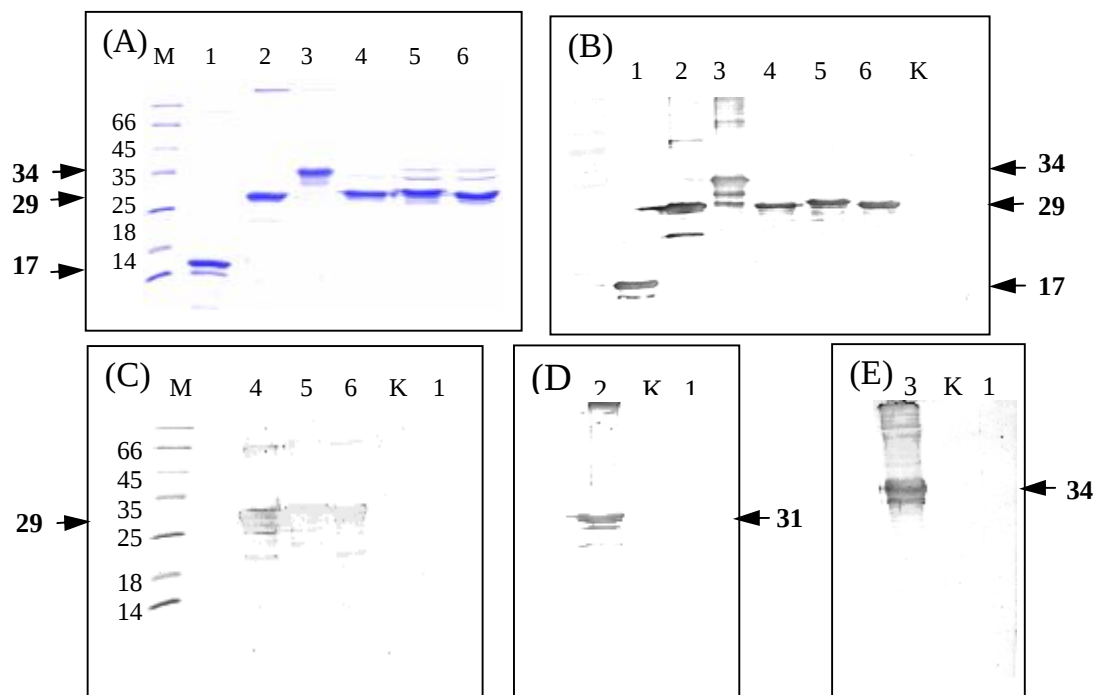
progresējošu infekciju un vāju ārstēšanas efektivitāti (Tanaka *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 1996).

Balstoties uz pieejamiem eksperimentāliem datiem par HCV epitopiem (<http://hcv.lanl.gov/content/immuno/immuno-main.html>), tika izraudzīti sekojoši HCV proteīnu fragmenti:

- ▼ HCV kora 1-98 aa, 1-151 aa, 1-173 aa;
- ▼ HCV NS3 202-326 aa, 327-482 aa;
- ▼ HCV HVR1 rajons ir stipri mainīgs, tāpēc mēs esam izmantojuši četrus HVR1 secības variantus HVR1 tetramēra molekulas iegūšanai, kas spētu inducēt plašu un krosreaktīvu imunitāti (detalizētai informācijai skatīt atbilstošu publikāciju). Agrākos pētījumos tika ziņots, ka visi šie varianti reaģē ar lielu skaitu hroniska hepatīta C pacientu serumu (Zucchelli *et al.*, 2001; Puntoriero *et al.*, 1998; Khudyakov, nav publicēts).

Himēru HBc/HCV daļiņu konstruēšanai tika izmantotas divas pieejas (1.att.): (1) svešas sekvences tika klonētas HBcAg proteīna galvenajā imunodominantajā rajonā (MIR); (2) HCV sekvences tika sapludinātas ar saīsināta HBcAg proteīna C galu.

Visas izveidotās rekombinantās plazmīdas ar HCV insercijām HBcAg MIR rajonā vai C galā (1.att.) uzrādīja relatīvi augstu rekombinantu sapludinātu proteīnu ekspresijas līmeni *E.coli* šūnās. Tomēr svešas insercijas netika tolerētas visos gadījumos, un pilnvērtīgu VLP veidošanās tika novērota ne ar visiem himērajiem proteīniem (3.att. G, H, I). Līdz ar to HCV kora proteīna fragmenta (1-98 aa) un HVR1 tetramēra insercija MIR rajonā noveda pie nepilnīgu vai deformētu daļiņu parādīšanās, kas veidoja nešķīstošus agregātus. Šo negatīvu rezultātu iemesli nav līdz galam saprotami. Kaut gan, datormodelēšanas (dati nav parādīti) rezultāti paredzēja, ka izvēlēto HCV inserciju sekvences MIR rajonā varēja izsaukt vairākas nozīmīgas izmaiņas HBc proteīna monomēru e1 cilpas un blakus esošo sekvenču sekundārajā struktūrā, tādējādi novēršot himēru dimēru savākšanos nobriedušajās regulārajās daļiņās. Pirmā NS3 proteīna fragmenta (202-326 aa) insercijas gadījumā HBc C galā mēs arī esam novērojuši pietiekamu himērā proteīna ekspresijas līmeni, bet šis proteīns veidoja tikai nepilnvērtīgas dažāda izmēra daļiņas, kurām bija tendence veidot agregātus un līdz ar to nebija iespējams attīrīt (3.att. I). Turpretī, HCV kora proteīna fragmenta (1-98 aa), HCV HVR1 tetramēra vai NS3 proteīna fragmenta (327-482 aa) insercija C galā noveda pie vēlamā rezultāta, t.i., pilnvērtīgu nobriedušu VLP veidošanās (3.att.B, E, F). Ir svarīgi piezīmēt, ka svešu sekvenču neveiksmīga insercija gan MIR rajonā, gan arī C galā tika ziņota vairākos svešu epitopu inserciju gadījumos (Ulrich *et al.*, 1998).



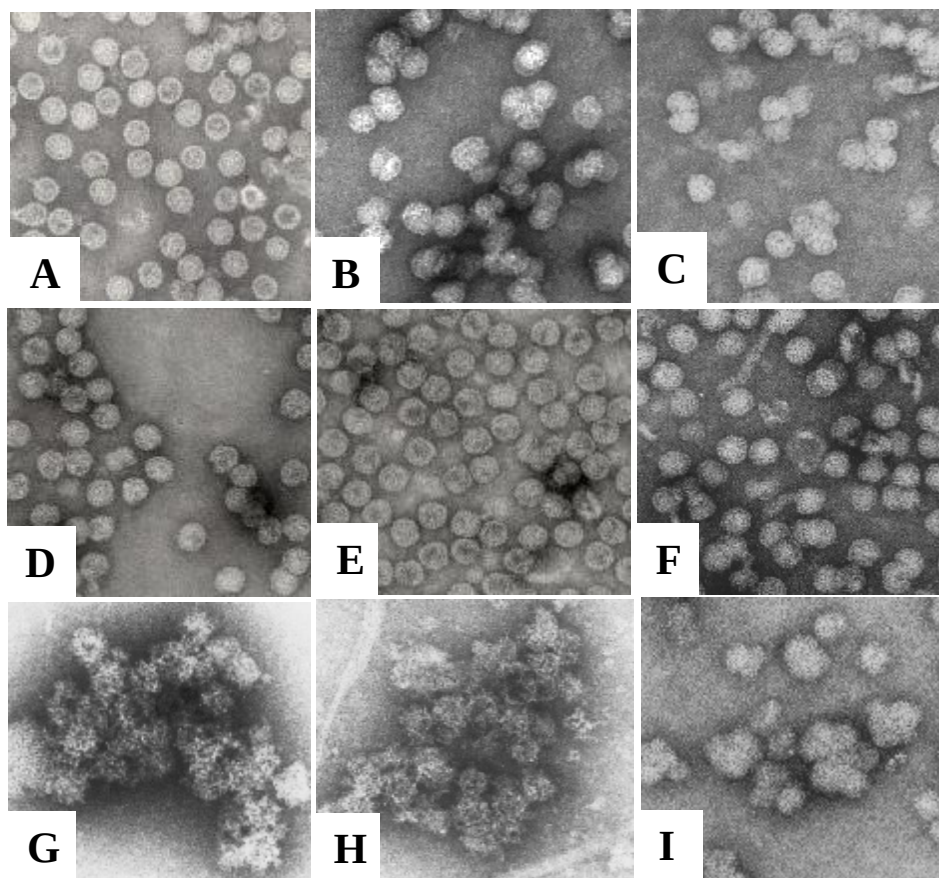
2.attēls. Oriģināla, no C gala saīsināta HBc proteīna un himēru sapludinātu HBc/HCV proteīnu noteikšana. Attīrītu daļiņu SDS-PAGE. Krāsošana ar Coomassie Brilliant blue R250 (A). Imunoblots ar monoklonālajām anti-HBc 13C9 antivielām (B), ar monoklonālajām anti-HCV kora C7-50 antivielām (C), ar monoklonālajām anti-HCV HVR1 3C7-C3 antivielām (D) un ar trušu poliklonālajām anti-HCV NS3 antivielām (E). Proteīnu molekulārās masas marķieris kDa (M); saīsinātais HBc (144 aa) (1); HBcCterm/HVR1tetramer (2); HBcCterm/NS3/327-482 (3); HBcCterm/core98 (4); HBcCterm/core98-SPRRR (5); HBcCterm-RGD/core98 (6) proteīni. Negatīvā kontrole, netransformētu *E.coli* K802 šūnu lizāts (K).

Mūsdienās joprojām nav pieejama daudz maz uzticama tehnoloģija noteiktu himēru HBc proteīnu dimēru pašsavākšanās paredzēšanai, tāpēc katra jauna himēra konstrukcija ir jāizpēta eksperimentāli. Ir neapšaubāmi skaidrs, ka insertētās sekvenču dabai un garumam, kā arī HBc vektora garumam un insercijas vietai ir ietekme uz daļiņu veidošanos (Ulrich *et al.*, 1998; Pumpens & Grens, 2001). Mēs sagaidām, ka mūsu pašreizējā pētījumā uzkrātie dati papildinās jau pieejamu informāciju par citām himērajām konstrukcijām un dos ieguldījumu mūsu izpratnē par morfoģenēzes un himēru, uz HBcAg pamata izveidotu daļiņu savākšanās mehānismu.

VLP veidošanās tika novērota arī garāku HCV kora fragmentu (1-151 aa un 1-173 aa) sapludināšanas ar HBc C galu (1.att.) gadījumā, bet kopējais šo konstrukciju inducētais proteīnu ekspresijas līmenis bija relatīvi zems, un, tādējādi, šie himērie proteīni tika izslēgti no turpmākajiem pētījumiem.

Lai izpētītu VLP imunogenitātes paaugstināšanas iespēju, konstrukcijā ar HCV kora 1-98 aa fragmenta inserciju tika ieviestas divas modifikācijas. Viena no tām paredzēja papildus RGD sekvenču introducēšanu himērā sapludinātā proteīna N galā. Dažādi ligandi, kas saistās ar

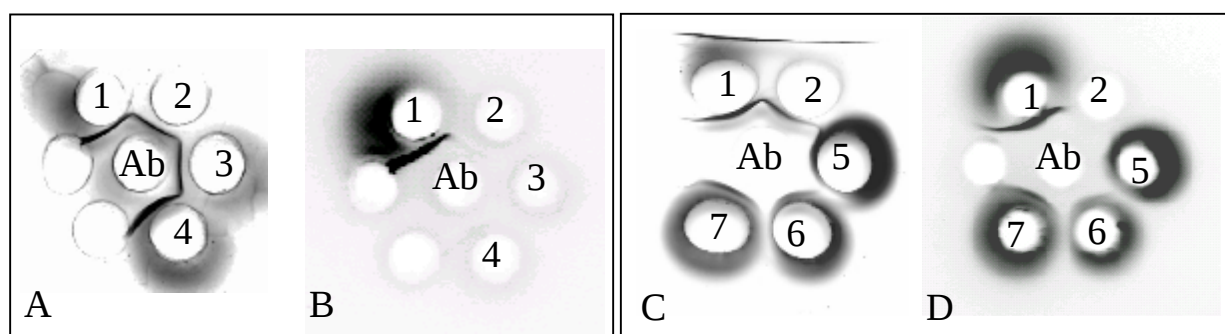
integrīniem, iekļauj RGD tripeptīdu. Ar integrīnu starpniecību notiekošas mijiedarbības ir nozīmīgas daudzos bioloģiskajos procesos tādos kā šūnu diferenciācija, imūnā atpazīšana, imūnā atbilde un asinsrece (Okada *et al.*, 2001). Cita konstrukcija saturēja papildus SPRRR sekvenci sapludinātā HBcCterm/core98 proteīna C galā (1.att.). Tika parādīts, ka pilna garuma HBcAg (1-183aa) vīrusveidīgās daļiņas, kas satur arginīniem bagātu rajonu C galā, spēj iepakot nukleīnskābi un tādējādi, inducēt T_H1 imunitāti, tai pašā laikā saīsinātā HBc proteīna (1-144aa



3.attēls. Attīrītu HBc/HCV daļiņu elektronmikrofotogrāfijas. Natīvas saīsināta HBc proteīna (1-144 aa) daļiņas (A) un himēro HBc/HCV proteīnu daļiņas: HBcCterm/core98 (B), HBcCterm-RGD/core98 (C), HBcCterm/core98-SPRRR (D), HBcCterm/HVR1tetramer (E), HBcCterm/NS3/327-482 (F), HBcMIR/HCVcore (G), HBcMIR/HVR1tetramer (H) un HBcCterm/NS3/202-326 (I). Palielinājums $\times 120000$.

vai 1-149aa) veidotās VLPs inducē T_H2 imunitāti (Riedl *et al.*, 2002). Tika noteikts, ka ar SPRRR sekvenci pietiek, lai VLPs inkorporētu nukleīnskābi (Sominskaya & Skrastina, nav publicēts). Šo divu modifikāciju ieviešanai nebija izteiktas negatīvas ietekmes uz producētu himēru VLP morfoloģiju (3.att. C, D). Pašsavākšanās spējas saglabāšana ir viens no svarīgākajiem faktoriem vakcīnu kandidātu konstruēšanā, jo tikai pareiza telpiska VLP organizācija var nodrošināt ieklonētu svešu secību augstu blīvumu, augstu simetriju un pareizu mērķēšanu, kā arī nodrošināt vēlamos gala VLP produktu imunoloģiskas un nogādāšanas īpašības (Pumpens & Grens, 2002).

Kopā piecas sekojošas hibrīdās konstrukcijas tika izmantotas tālākiem pētījumiem: HBcCterm/core98, HBcCterm-RGD/core98, HBcCterm/core98-SPRRR, HBcCterm/HVR1tetramer un HBcCterm/NS3/327-482 (1.att.). Ar attiecīgajām rekombinantajām plazmīdām transformēto šūnu producētās himerās VLPs tika attīrītas ar gēlfiltrāciju uz sefarozes CL-4B un saharozes gradienta centrifugēšanu. Attīrīto himēro daļiņu paraugi tika pakļauti SDS-PAAG elektroforēzes un imunoblota analīzēm (2.att.). Eksperimenti demonstrēja paredzēta lieluma proteīnu joslu esamību katrā paraugā. Sapludinātie proteīni reaģēja gan ar antivielām pret nesēja proteīnu (HBcAg) (2.att. B), gan ar specifiskām antivielām pret HCV proteīniem (2.att. C, D, E). Elektronmikroskopijas analīze parādīja vienāda izmēra (ap 35 nm) VLP esamību visos proteīnu paraugos (3.att.). Saskaņā ar vispārējo pieņēmumu (Pumpens & Grens, 2002) viens no kritiskajiem jautājumiem, kas ir saistīti ar VLP tehnoloģiju, ir stingra nepieciešamība kontrolēt iepakoto nukleīnskābi himērajās daļiņās. Proteīnu preparātu tīrība no nenoteiktas dabas nukleīnskābēm ir viens no svarīgākajiem moderno vakcīnu ražošanas priekšnoteikumiem. Šī iemesla dēļ mēs esam izveidojuši HBcAg atvasinājumus ar saīsinātajiem nukleīnskābju saīstošajiem motīviem. Nukleīnskābju klātbūtnes kontrolei daļēji attīrīto himēro proteīnu paraugos tika izmantota agarozes gēla radiālā imunodifūzija. Šo gēlu krāsošana ar krāsu



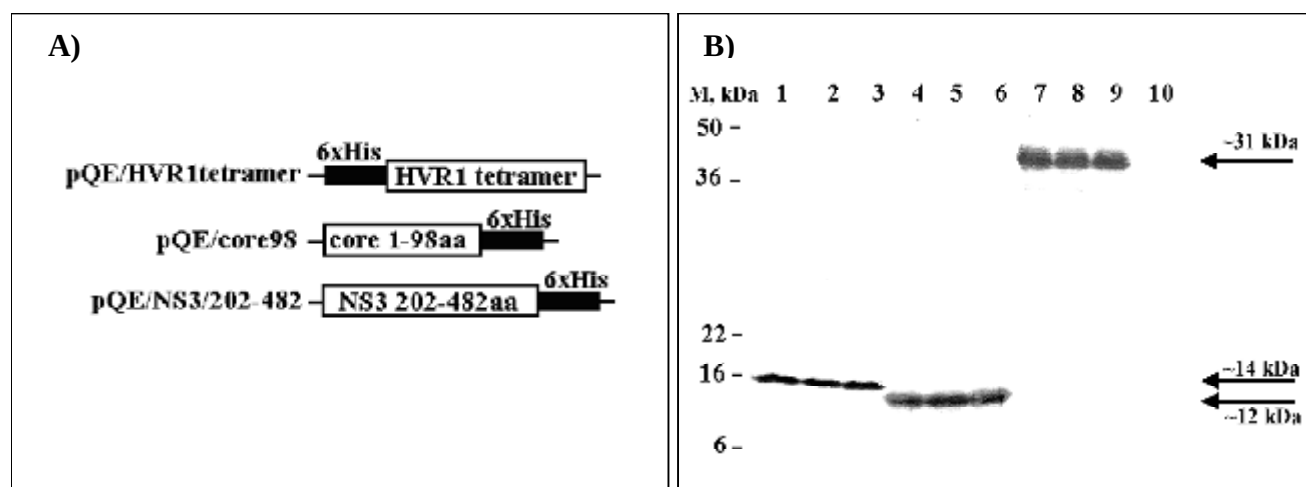
4.attēls. HBc un himero HBc/HCV daļiņu nukleīnskābes noteikšana ar agarozes gēla imunodifūzijas palīdzību un krāsošanu ar etīdija bromīdu. Agarozes gēli tika krāsoti ar Coomassie Brilliant blue R250 (A, C) vai etīdija bromīdu (B, D). Perifērijas šūniņas: natīvās HBcAg daļiņas (1); saīsinātā HBc proteīna (144 aa) daļiņas (2); HBcCterm/HVR1tetramer daļiņas (3); HBcCterm/NS3/327-482 daļiņas (4); HBcCterm/core98 daļiņas (5); HBcCterm/core98-SPRRR daļiņas (6); HBcCterm-RGD/core98 daļiņas (7). Centrālā šūniņa – poliklonālās truša anti-HBc antivielas (Ab).

Coomassie Brilliant blue demonstrēja daļiņu klātbūtni visos paraugos, kas spēja reaģēt ar anti-HBc antivielām (4.att. A, C). Tajā pašā laikā, pēc gēlu krāsošanas ar etīdija bromīdu spēcīga pozitīva reakcija bija vērojama tikai paraugam ar pilna garuma HBcAg proteīna veidotajām daļiņām (4.att.B, D). Šie rezultāti norāda uz iepakotās nukleīnskābes molekulu neesību vai ļoti niecīgu daudzumu saīsinātā HBc proteīna daļiņās, tā pat kā visās himērajās VLPs, ieskaitot himēras, kas satur papildus SPRRR asti (tā tiek uzskatīta par nukleīnskābi saistošu sekvenci

(Riedl *et al.*, 2002; Storni *et al.*, 2004)). Ir pilnīgi iespējams, ka himērās daļiņas ar SPRRR sekvenci spēj pakot nukleīnskābi, bet daļiņu poras ir lielas, un nukleāzes tiek klāt iepakotajām nukleīnskābes molekulām un iznīcina tās.

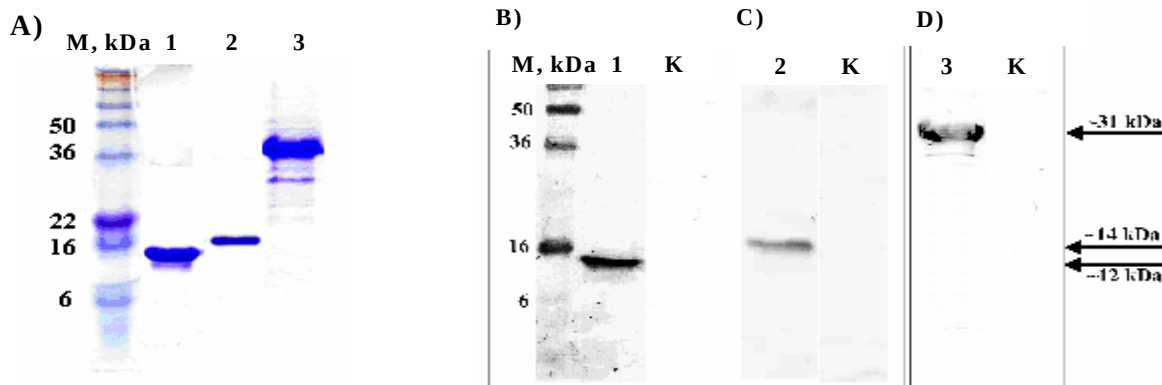
6' His HCV proteīnu ekspresija

Nākamais šī pētījuma uzdevums bija salīdzināt HCV determinantu (kas tika izmantotas HBc/HCV VLP konstruēšanai) imunogenitāti bez HBc nesēja. Šim nolūkam tika izraudzīti pQE-60 un pQE-30 ekspresijas vektori, kas nodrošina proteīna attīrīšanu izmantojot histidīnu asti (His Tag) kodējošo sekvenci 3' vai 5' galā attiecība pret klonēšanas rajonu. Tika izvēlēti HCV kora aa 1-98, NS3 aa 202-482 un HVR1 tetramēra fragmenti His-Tag HCV (6×His HCV) konstrukciju izveidei (5.att. A). Visas rekombinantās plazmīdas (pQE/core98, pQE/NS3/202-482 un pQE/



5.attēls. Pētījumā izmantoto rekombinanto 6' His/HCV konstrukciju shematiska parādīšana (A), un 6×His/HCV proteīnu noteikšana imunoblotā ar peļu monoklonālajām anti-penta His antivielām (Qiagen) (B). Proteīnu molekulārās masas marķieris kDa (M); 6×His/HVR1tetramer dažādi subkloni, ~14 kDa (1-3); core98/6×His dažādi subkloni, ~12 kDa (4-6); NS3/202-482/6×His dažādi subkloni, ~31 kDa (7-9); negatīvā kontrole, netransformēto *E.coli* JM109 šūnu lizāti (10).

/HVR1tetramer) ar HCV sekvenču insercijām inducēja relatīvi augstu rekombinantā proteīna sintēzi *E.coli* šūnās. 5.attēlā (B) ir parādīts kopējais rekombinanto proteīnu ekspresijas līmenis baktēriju šūnās. No katras konstrukcijas imunoblotā ar anti –penta His antivielām tika analizēti trīs subkloni. Rekombinantie proteīni veidoja ieslēguma ķermenīšus, un tāpēc proteīnu tīrīšanai tika izraudzīti denaturējošie apstākļi.

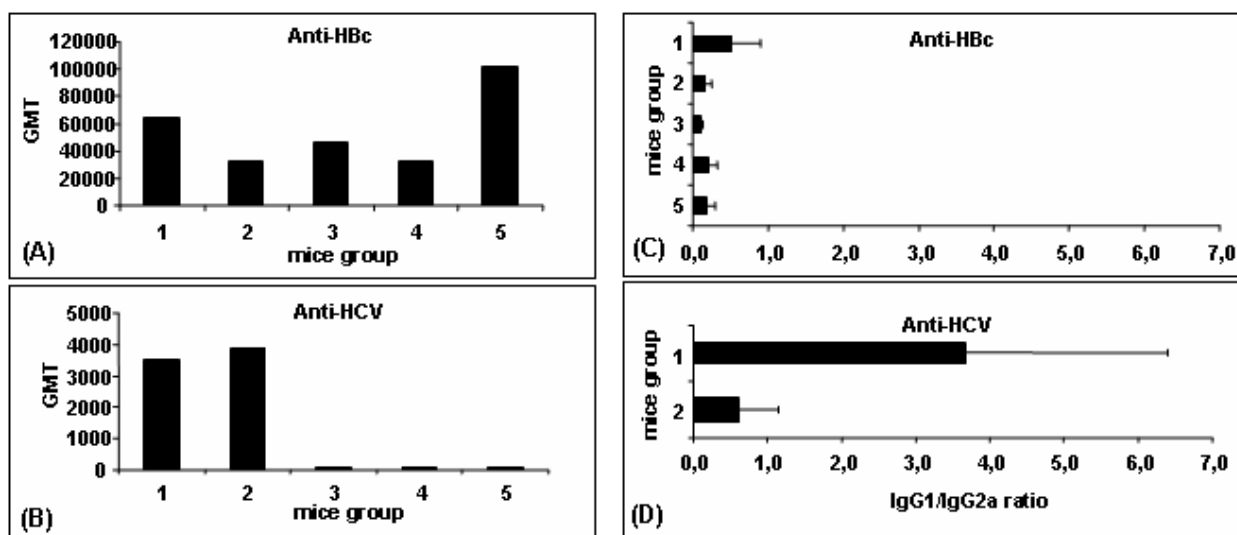


6.attēls. Attīrīto rekombinanto 6×His/HCV proteīnu noteikšana. Attīrīto proteīnu SDS-PAGE analīze. Krāsošana ar Coomassie Brilliant blue R250 (A), imunoblots ar peļu monoklonālajām anti-HCV kora C7-50 antivielām (B), ar peļu monoklonālajām anti-HCV HVR1 3C7-C3 antivielām (C), un ar truša poliklonālajām anti-HCV NS3 antivielām (D). Proteīnu molekulārās masas marķieris kDa (M); core98/6×His, ~12 kDa (1); 6×His/HVR1tetramer, ~14 kDa (2); NS3/202-482/6×His, ~31 kDa (3); negatīvā kontrole, attīrītais saīsinātā hepatīta B vīrusa kora proteīns (144 aa) (K).

6×His HCV proteīni tika attīrīti ar afīnās hromatogrāfijas palīdzību uz Ni-NTA agarozes izmantojot 6M GuHCl līzes buferi un 8M urīnvielas eluēšanas buferus. Pēc proteīnu eluēšanas no Ni-NTA nesēja tika veikta secīga proteīnu renaturācija izmantojot urīnvielas aizvākšanu ar dialīzes palīdzību pret PBS. Attīrītie rekombinantie HCV proteīni tika pakļauti SDS-PAGE analīzei. Krāsošana ar *Coomassie Blue R250* norāda uz visu rekombinanto proteīnu tīrību virs 95% (6.att. A). Iegūto proteīnu paraugu specifiskums tika apstiprināts imunoblotā ar specifiskajām anti-HCV antivielām (6.att. B, C, D).

HBc/HCV VLPs un 6×His HCV proteīnu imunogenitātes novērtēšana

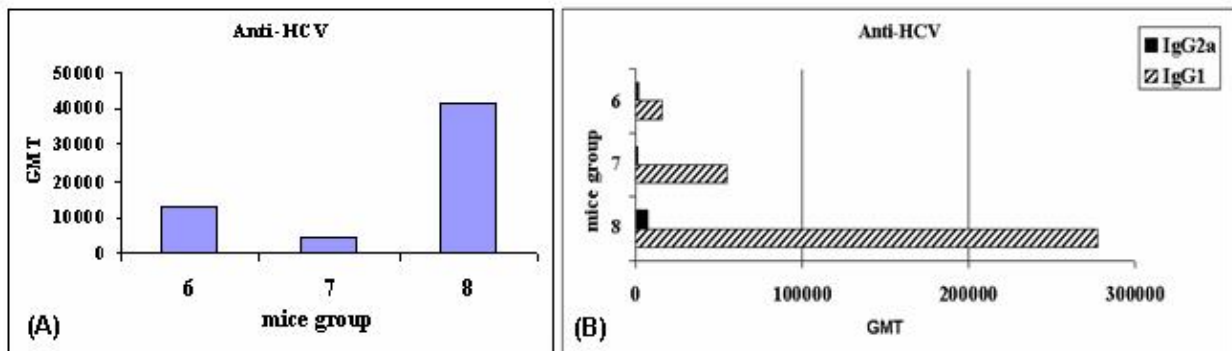
Ar gēlfiltrācijas un saharozes gradienta centrifugēšanas palīdzību attīrītās himērās VLPs tika izmantotas imunogenitātes pētījumiem BALB/c pelēs. Pēc trīs subkutānām injekcijām tika noteikta kā humorālā, tā arī T šūnu proliferatīvā imūnā atbilde. Tika reģistrēta dažādu līmeņu imūnā atbilde gan pret nesēja proteīnu (HBc), gan pret ieklonētajiem HCV epitopiem, norādot uz klātesošo HCV proteīnu secību HBc proteīna imunogenitātes modulējošo ietekmi. Īpaši interesants novērojums bija ievērojami augstāku anti-HBc antivielu titru (7.att.) indukcija imunizācijā ar HBcCterm-RGD/core98 VLP nekā imunizācijā ar HBcCterm/core98-SPRRR ($p=0.06$) vai HBcCterm/core98 ($p=0.035$) proteīniem.



7.attēls. Ar himērajām HBc/HCV daļiņām imunizēto peļu serumu antivielu titri.

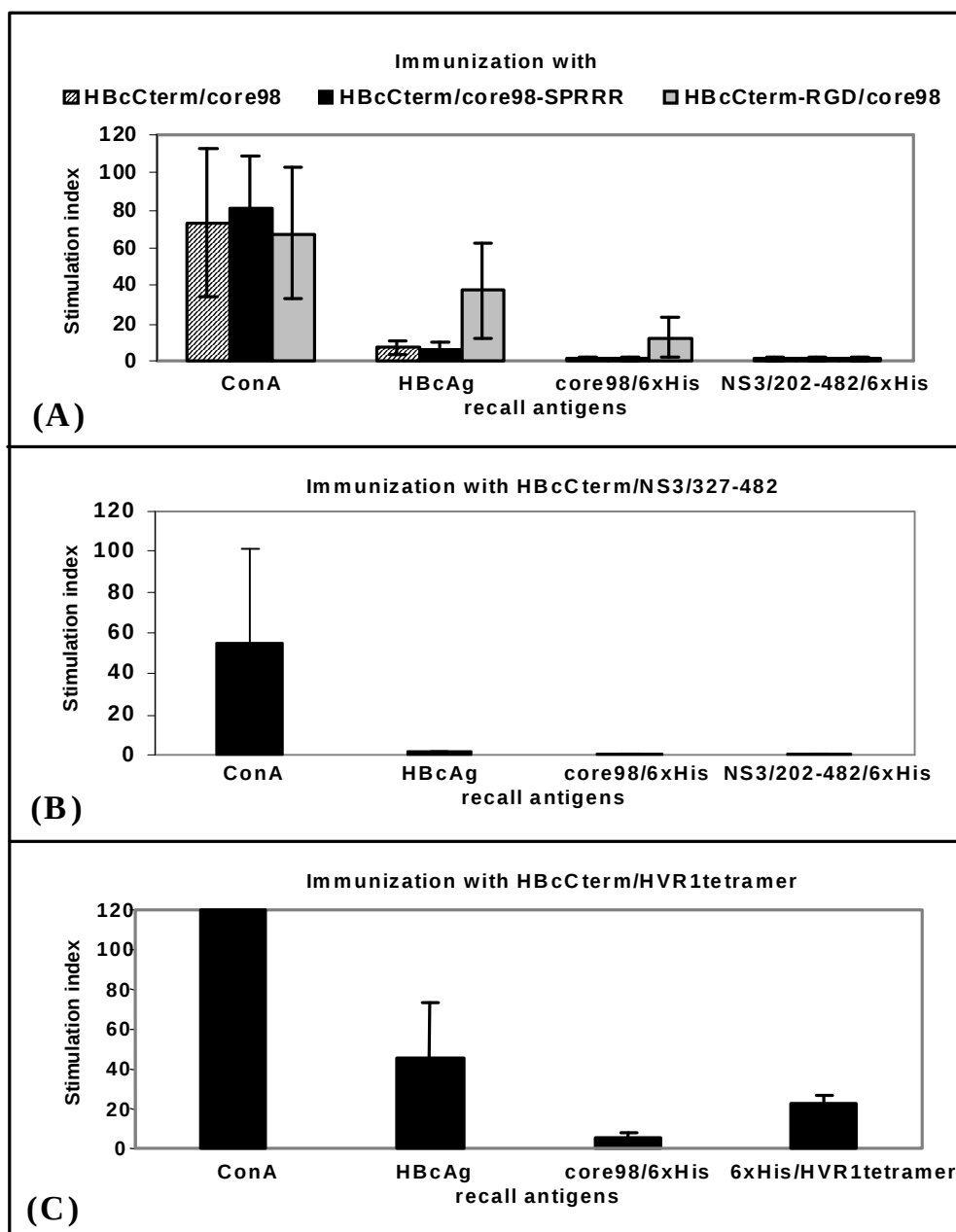
Anti-HBc antivielas (A); anti-HCV core, anti-NS3 un anti-HVR1tetramer antivielas (B); anti-HBc antivielu IgG1/IgG2a subklašu attiecība (C); anti-HVR1tetramer un anti-NS3 antivielu IgG1/IgG2a subklašu attiecība (D). GMT – vidējais ģeometriskais titrs. Imunizēto peļu grupas: HBcCterm/HVR1tetramer (1), HBcCterm/NS3/327-482 (2), HBcCterm/core98 (3), HBcCterm-RGD/core98 (4) un HBcCterm/core98-SPRRR (5).

Proliferācijas testā imunizēto peļu splenocīti tika stimulēti ar HBc un HCV proteīniem (9.att.). Šie „atgādināšanas” (*recall*) antigēni iekļāva attīrītu saīsināto HBc un HCV antigēnus core98/6×His, 6×His/HVR1tetramer un NS3/202-482/6×His ekspresētus *E.coli* šūnās kā His-tag konstrukcijas. Augstāka proliferatīvā atbilde gan pret HBc, gan pret HCV kora proteīnu arī bija vērojama ar HBcCterm-RGD/core98 daļiņām imunizēto peļu splenocītiem (9.att. A). Tādējādi, mūsu pieņēmums, ka RGD tripeptīda iekļaušana HBc daļiņu sastāvā var novest pie proteīna imunogenitātes paaugstināšanas, tika apstiprināts. Šajā sakarā ir būtiski minēt, ka ar RGD sekvenču iekļaušanu adenovīrusa pavedienveida izauguma (*fiber knob*) HI cilpā tika panākta antigēnu gēnu transdukcijas uzlabošana (Okada *et al.*, 2001). Šāda adenovīrusa modifikācija veicināja mijiedarbību starp virioniem un α -integrīniem uz peļu un cilvēku dendrītu šūnām (DC), kā arī sekmēja vīrusa daļiņu internalizāciju ar dramatisku transdukcijas efektivitātes paaugstināšanos. Daži cilvēki var domāt, ka imunogenitātes paaugstināšanas efekts, kas tika novērots mūsu pētījumā, bija arī pateicoties augstākai VLP saistīšanās pakāpei ar DC caur RGD mijiedarbību ar α -integrīniem, kas savukārt noveda pie efektīvākas daļiņu internalizācijas ar dendrītu šūnām. Mēs uzskatām, ka šāda, uz RGD balstīta, VLP mērķēšana uz DC (un, iespējams, arī uz citām antigēnu prezentējošām šūnām), ja tiks apstiprināta arī citos pētījumos, var izrādīties par ļoti noderīgu pieeju nākotnes vakcīnu izveidē.



8.attēls. Ar rekombinantajiem 6' His/HCV proteīniem imunizēto peļu serumu antivielu titri (A) un anti-HCV antivielu IgG1/IgG2a subklašu attiecība (B). GMT – vidējais ģeometriskais titrs. Peļu grupas imunizētas ar: core98/6×His (6), 6×His/HVR1tetramer (7) un NS3/202-482/6×His (8).

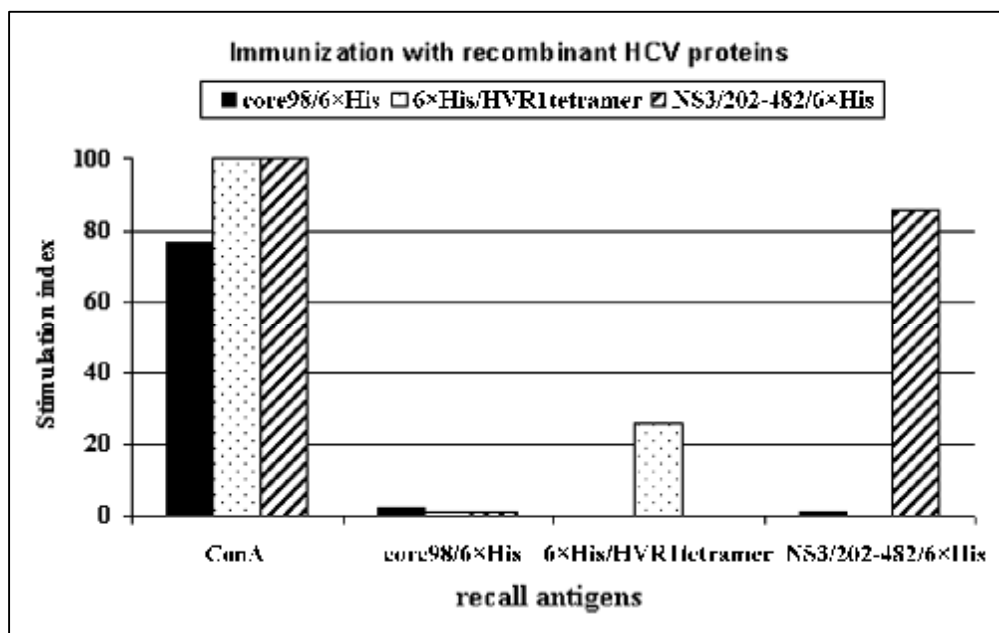
HCV kora fragmentu imunogenitātes salīdzināšanai BALB/c peles tika imunizētas arī ar core98/6×His proteīnu. Imunizācija ar attīrītu HCV kora antigēna fragmentu aa 1-98 noveda pie labas anti-kora antivielu atbildes (8.att. A), kas netika novērots ne ar vienu no pētījumā izmantotajām HBc/HCVcore daļiņām (7.att. B). Šo faktu varētu izskaidrot ar himēro HBcCterm/core98 VLPs organizāciju un HCV kora inserta nepieejamību uz VLPs virsmas, ko apstiprina tādi eksperimenti kā imunoizolācija elektronmikroskopijā un konkurences ELISA (dati nav parādīti). B šūnu epitopu ekspozīcijai uz virsmas ir milzīga nozīme antivielu inukcijā (Pumpens & Grens, 2002). Tajā pašā laikā tika detektēta ļoti vāja proliferācija uz to pašu antigēnu (core98/6×His) (10.att.), kas jau tika ievērots imunizācijā ar HBcCterm/core98 VLPs (9.att. A). Iemesls augstāk minētajam novērojumam nav pilnīgi izprotams. Tika izteikta doma, ka tieši antigēnu strukturētā daba varētu piešķirt proteīniem imunogenitāti. Tādējādi, viena pētnieku grupa ziņoja, ka HCV kora fragments aa 1-120 spēj veidot vīrusveidīgās daļiņas, un, ka šīs daļiņas parādīja relatīvi augstu imunogenitāti (Alvarez-Obregon *et al.*, 2001). Cita grupa ziņoja, ka pat saīsinātais HCV kora proteīna fragments (aa 1-79) spēja savākties nukleokapsīdu veidīgajās struktūrās (Majeau *et al.*, 2004). Turpretī mēs nespējam noteikt vīrusveidīgo daļiņu veidošanos mūsu core98/6×His proteīna paraugā. Par iemeslu šai pretrunai varētu būt šajā pētījumā izmantotā core98 His-tag proteīna attīrīšana no ieslēguma ķermenīšiem denaturējošos apstākļos vai arī pārāk zema beigu proteīna parauga koncentrācija. Attīrīšanas pieeja varētu novest pie neatgriezeniskas proteīna denaturācijas un renaturācijas neiespējamības dialīzes procedūras laikā. Core98/6×His proteīna problēma ar nešķīstošu agregātu veidošanu varētu tikt risināta izmantojot citu ekspresijas vektoru un citus baktēriju celmus, kā arī veicot rekombinantā proteīna indukciju zemākā temperatūrā vai saīsinot indukcijas laiku. Nesen tika ziņotas šādu pieeju perspektīvas īsu HCV kora proteīna fragmentu ekspresijā (Majeau *et al.*, 2004). Darbs ar core98/6×His ekspresijas optimizāciju dažādās ekspresijas sistēmās šobrīd tiek papildināts.



9.attēls. Ar himērajām HBc/HCV daļiņām imunizēto peļu splenocītu proliferatīvā atbilde. Ar HBcCterm/core98, HBcCterm-RGD/core98 vai HBcCterm/core98-SPRRR imunizēto peļu splenocīti (A); ar HBcCterm/NS3/327-482 imunizēto peļu splenocīti (B); ar HBcCterm/HVR1tetramer imunizēto peļu splenocīti (C). Vertikālie stabiņi – standartnovirze (SD). Stimulācijas indeksi pie indukcijas ar konkanavalīnu A (ConA) visos eksperimentos pārsniedza 50.

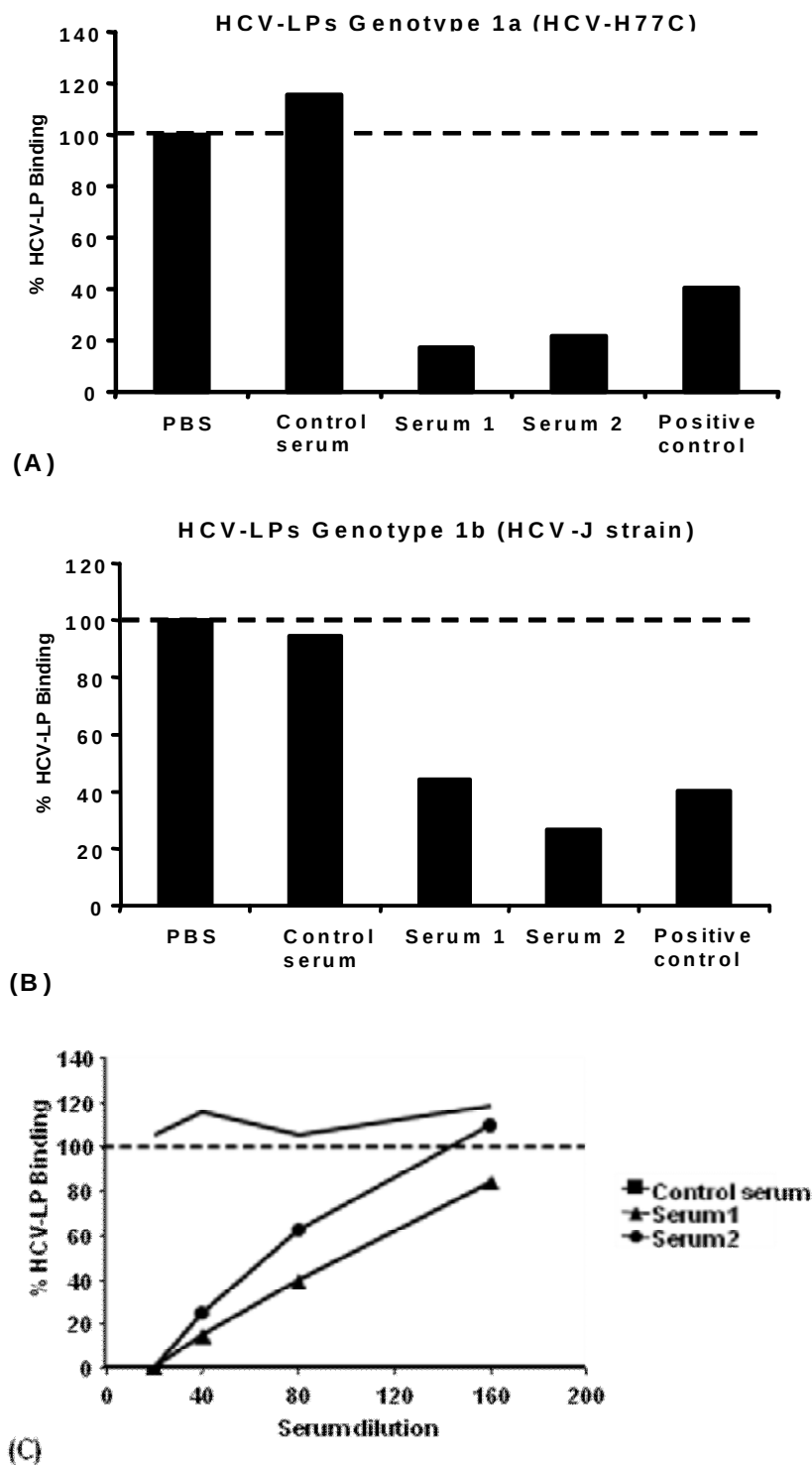
Turpretī, himērās daļiņas ar HCV NS3 secību bija spējīgas izraisīt spēcīgu humorālu atbildi gan pret nesēja antigēnu (HBcAg), gan pret NS3 epitopiem (7.att. A, B), bet proliferācija splenocītos tika reģistrēta tikai uz HBcAg, un tā bija negaidīti zema (9.att. B). Atklātās pretrunas attiecībā uz atšķirīgu HBc/HCV himēro konstrukciju imunogēno potenciālu nav pilnīgi skaidras. Pirmkārt, visdrīzāk to nevarētu attiecināt uz izmantoto HCV antigēnu strukturālajām atšķirībām vai arī uz peļu genētiskajām īpašībām. Gan augsti HCV specifisku antivielu titri, gan arī

ievērojamā proliferatīvā atbilde tika novērota pēc tā paša celma BALB/c peļu imunizācijas ar His-tag HCV NS3 fragmentu aa 202-482 (8.att. A; 10.att.). Otrkārt, novērotās himēro daļiņu imunogenitātes atšķirības varētu būt dēļ atšķirīgas HCV secību prezentācijas himērajās daļiņās. Iegūtie dati - proliferatīvās atbildes trūkums uz NS3 epitopiem un samērā zems splenocītu proliferācijas līmenis pēc imunizācijas ar HCV koru saturošajām VLPs - apstiprina un papildina šo pieņēmumu. Noteikti vēl šobrīd nezināmi faktori arī spēj ietekmēt himēro daļiņu ar C terminālajiem insertiem imunogēno potenciālu. Šo faktoru noskaidrošana varētu būt nepieciešama tālākajiem pētījumiem, kas vērsti uz HBc atvairināto VLP izmantošanu vakcīnu prototipu konstruēšanai.



10.attēls. Proliferatīvā peļu, imunizētu ar 6xHis/HCV proteīniem, splenocītu atbilde. Tika veikta kontroles reakciju sērija, lai noteiktu proliferācijas testa fonu, kas varētu būt paaugstināts proteīnu His-tag astes dēļ vai citu bakteriālo proteīnu klātbūtnes attīrītajos preparātos dēļ. NS3/202-482/6xHis proteīns tika izmantots ar core98/6xHis proteīnu imunizēto peļu splenocītu stimulācijai, un core98/6xHis proteīns tika ņemts ar NS3/202-482/6xHis un 6xHis/HVR1tetramer proteīniem imunizēto peļu splenocītu stimulācijai.

Himērās daļiņas, kas saturēja HVR1 tetramēru izrādījās par visefektīvāko imunogēnu. Tās spēja inducēt augstu humorālo un proliferatīvo imūno atbildi gan pret nesēja antigēnu, gan arī pret HCV epitopiem (7.att. A, B; 9.att. C). Ar vien populārāks kļūst uzskats, ka efektīvai profilaktiskai un terapeitiskai vakcīnai jābūt spējīgai inducēt ne tikai spēcīga un multispecifiska T šūnu atbilde, bet arī plaša un krosreaktīva humorāla atbilde uz vīrusu neitralizējošiem epitopiem, pirmām kārtām, pret galveno neitralizējošo epitopu, kas atrodas HVR1 rajonā (Houghton & Abrignani, 2005; Steinmann *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 1999; Lavillette *et al.*, 2005). Šajā pētījumā mēs esam izmantojuši nevis vienu HVR1 secību, bet četru dažādu HVR1 sekvenču



11.attēls. HCV līdzīgo daļiņu (E1/E2) saistīšanās ar HuH7 šūnām inhibīcija, izmantojot divus peļu serumus pēc imunizācijas ar HBcCterm/HVR1tetramer daļiņām. HCV līdzīgo daļiņu subtipa 1a (A) un subtipa 1b (B) saistīšanās inhibīcija. Seruma antivielu koncentrācijas atkarīgā HCV-LP saistīšanās inhibīcija (C). HCV-LP saistīšanās PBS klātbūtnē tika pieņemta par 100% (negatīvā kontrole) (PBS); serums (1:20) no peles pirms imunizācijas (negatīvā kontrole) (Control serum); serums (1:20) no 1. peles imunizētas ar HBcCterm/HVR1tetramer daļiņām (Serum 1); serums (1:20) no 2. peles imunizētas ar HBcCterm/HVR1tetramer daļiņām (Serum 2); monoklonālās anti-E2 antivielas AP33 (50 µg/ml) (pozitīvā kontrole) (Positive control).

variantu kombināciju, lai izveidotu multispecifiska epitopa modeli, kas spētu inducēt antivielas reaģējošas ar lielu skaitu HVR1 secību variantu. Tā rezultātā, serumi no pelēm, kas tika imunizētas ar tetramēra molekulu saturošajām VLP, spēja reaģēt ar 55% HVR1 variantu atvasinātu no 172 HCV lauku izolātiem (dažāda genotipa) (dati nav parādīti). Turklāt, tie paši serumi bija spējīgi inhibēt dažādu genotipu (1a un 1b) HCV veidīgo daļiņu saistīšanos ar Huh7 šūnām surogāta „vīrusa neitralizācijas” testā (11.att.; dati tika iegūti sadarbībā ar Dr. Tomasu Baumertu, Fraiburga, Vācija).

Lai salīdzinātu imūno atbildi uz HVR1 tetramēru, BALB/c peles tika imunizētas ar HVR1tetramer His-tag proteīnu. Pirms imunizācijas mēs esam paveikuši vienu papildus ELISA eksperimentu ar 6×His/HVR1tetramer proteīnu un nejauši izvēlētajiem HCV pacientu serumiem (dati nav parādīti). Tika pierādīts, ka HVR1 tetramēra komplekss reaģēja ar 75% no izmantoto serumu, ieskaitot serumus no pacientiem, kas bija inficēti ar tādiem HCV subtipiem kā 1a, 1d, 2b, 3a un 4. Tajā pašā laikā, mūsu HVR1 tetramēra konstrukcijas atsevišķs komponents, mimotops R9, pats par sevi reaģēja tikai ar 45% no serumiem un parādīja krietni šaurāku HCV subtipu atpazīšanu. Imunizācijas rezultātā, 6×His/HVR1tetramer proteīns inducēja spēcīgu humorālu (8.att. A) un šūnu (10.att.) imūno atbildi, apstiprinot rezultātus, kas tika iegūti imunizācijā ar HBcCterm/HVR1tetramer VLPs (7.att. B; 9.att. C). Šobrīd mēs mēģinām izvērtēt anti-HVR1 tetramēra serumu spēju neitralizēt HCV augšanu speciāli šim nolūkam pielāgotajās šūnu kultūrās.

Humorālā imūnā atbilde gan uz HBc/HCV VLPs, gan uz 6×His/HCV proteīniem tika izvērtēta arī attiecībā uz IgG1 un IgG2a antivielu subklašu produkciju. Visām, ar HBc/HCV VLPs imunizēto pelu grupām serumu anti-HBc antivielu IgG1/IgG2a attiecība (7.att. C) bija zemāka par 1.0, kas liecina par tendenci uz T_H1 imūno atbildi. Līdzīga pārslēgšanās uz predominanti IgG2a antivielu ražošanu tika novērota arī anti-NS3 antivielām (7.att. D). 6×His/HCV proteīnu inducētās anti-HCV antivielas bija galvenokārt IgG1 subklases antivielas (8.att.), norādot uz spēcīgāku T_H2 tipa imūnās atbildes veidošanos. Papildinot proliferācijas datus, kas tika iegūti imunizācijā ar 6×His/HVR1tetramer un NS3/202-482/6×His proteīniem, IgG subklašu aina lika mums domāt, ka šajos gadījumos tika panākta samērā labi sabalansēta T_H1/T_H2 imūnā atbilde.

Šī „principa pierādīšana” (“proof-of-principle”) ļauj turpināt, kā arī nodrošina nākamās mūsu programmas etapus – detalizētāku pietiekamu HVR1 variantu izvēli, himēro VLP dizaina optimizāciju un inducēto antivielu spēju „neitralizēt” HCV veidīgo daļiņu (kas atvasinātas no dažādu vīrusa genotipu proteīniem) novērtēšanu.

Secinājumi

1. Mēs esam izvēlējušies relatīvi lielus HCV proteīnu (kora, NS3 un E2) fragmentus, kas satur vairākus svarīgus B un T šūnu epitopus. NS3 proteīnam tika atrasti divi tādi rajoni: NS3 aa 202-326 un aa 327-482. T šūnu epitopi ir izklaidēti pa visu HCV kora proteīnu, šī iemesla dēļ mēs esam izmantojuši dažāda garuma kora fragmentus: kora aa 1-98, aa 1-151 un aa 1-173. Četri E2 proteīna HVR1 rajona varianti tika izvēlēti tetramērās molekulas konstruēšanai, lai nodrošinātu plašu un krosreaktīvu imūno atbildi.
2. Eksperimentālie dati iedrošināja mūs izmantot dažādus hepatīta B kora ekspresijas vektorus, jo tika paredzēts, ka ne visas konstrukcijas ar HCV epitopu insercijām būs veiksmīgas. Tika izmantotas divas galvenās pieejas HBc/HCV himēro proteīnu konstruēšanā: svešu secību klonēšana HBc (HBc149) galvenajā imunodominantajā rajonā (MIR) un HCV sekvenču insercija HBc (HBc144) C galā.
3. Elektornmikroskopijas analīze atklāja, ka himērie HBcCterm/core98, HBcCterm-RGD/core98, HBcCterm/core98-SPRRR, HBcCterm/HVR1tetramer un HBcCterm/NS3/327-482 proteīni veido labi noformētās vīrusveidīgās kapsīdas. Turpretī, vīrusveidīgo daļiņu veidošanās netika novērota HBcMIR/HCVcore, HBcMIR/HVR1tetramer un HBcCterm/NS3/202-326 himēro proteīnu gadījumā, norādot uz HCV insertu efektu uz HBc proteīna pašsavakšanās spēju. Visas HBc/HCV himērās daļiņas, ieskaitot tās, kas saturēja SPRRR secību, nespēja pakot nukleīnskābi.
4. HBcCterm/HVR1tetramer VLPs izrādījās par visefektīvāko imunogēnu no visiem testētajiem HBc/HCV proteīniem. Tās spēja inducēt relatīvi augstu gan humorālu, gan šūnu imūno atbildi. IgG subklašu aina lika mums secināt, ka HBcCterm/HVR1tetramer proteīns inducēja reālīvi sabalansētu T_H1/T_H2 atbildi. Diezgan interesanti un pat negaidīti rezultāti tika iegūti ar HBcCterm/NS3/327-482 proteīnu, kur imunizācijas laikā tika konstatēta tikai spēcīga antivielu atbilde. HBc/HCVcore konstrukcijas nespēja inducēt HCV specifisku antivielu atbildi un parādīja vāju proliferāciju. Bet ir ļoti svarīgi uzsvērt, ka peļu imunizācijā ar HBc/HCVcore konstrukciju, kas saturēja RGD tripeptīdu, tika novērots krietni augstāks anti-HBc antivielu titrs. Tādējādi, mūsu pieņēmums, ka RGD motīva iekļaušana HBc daļiņās noved pie imunigenitātes paaugstināšanas, tika apstiprināts.

5. HBc/HCV VLPs imunogenitāte tika salīdzināta ar tiešajā ekspresijā iegūto HCV proteīnu imunogenitāti. 6×His/HVR1tetramer proteīns inducēja relatīvi spēcīgu humorālu, kā arī šūnu HCV specifisku imūno atbildi, kā jau tika novērots imunizācijā ar HBcCterm/HVR1tetramer VLPs. Pretrunīgi dati tika iegūti HBcCterm/NS3/327-482 un NS3/202-482/6×His, kā arī HBc/HCVcore (visu trīs tipu VLPs) un core98/6×His rekombinanto proteīnu gadījumā. Pirmajā gadījumā NS3/202-482/6×His proteīns spēja inducēt ļoti labu HCV specifisku gan humorālu, gan arī T šūnu atbildi, otrajā gadījumā core98/6×His proteīns inducēja anti-HCV kora antivielas, kas netika panākts peļu imunizācijā ne ar vienu no HBc/HCVcore daļiņām. Atrastās pretrunas dažādu HBc/HCV daļiņu un 6×His HCV proteīnu imunogenitātes potenciālā nav pilnīgi skaidras. Pirmkārt, diezvai to varētu attiecināt uz HCV antigēnu strukturālo īpašību atšķirību vai peļu ģenētisko vēsturi. Otrkārt, himēro daļiņu novērotās imunogenitātes atšķirības varētu rasties dēļ nevienlīdzīgas ieklonēto HCV sekvenču prezentācijas himēro daļiņu sastāvā.
6. Pētījumā iegūtie rezultāti demonstrēja principiālu HBc atvasināto VLP izmantošanas iespēju jauna tipa HCV specifisko imunogēnu izveidei. Kaut gan jāiegulda vēl daudz darba pirms gala secinājuma izdarīšanas attiecībā uz izmantotās pieejas perspektīvām. Šis papildus darbs varētu iekļaut: (i) himēro daļiņu dizaina optimizāciju, (ii) mozaīkveida daļiņu izmantošanu, kas satur vairākus epitopus no dažādiem HCV proteīniem, un (iii) šo optimizēto konstrukciju spēju inducēt ne tikai humorālu, bet arī spēcīgu un plašu šūnu imūno atbildi pret vairākiem vīrusa epitopiem.

Publikāciju saraksts

Šis darbs balstās uz sekojošajām publikācijām:

Mihailova M., Sominskaya I., Viazov S., Pumpens P. 2007. Is vaccine against HCV possible?”. *Acta Universitatis Latviensis*, 723: 123-143.

Mihailova M., Fiedler M., Boos M., Petrovskis I., Sominskaya I., Roggendorf M., Viazov S., Pumpens P. 2006. Preparation of hepatitis C virus structural and non-structural protein fragments and studies of their immunogenicity. *Protein Expr. Purif.*, 50(1):43-8.

Mihailova M., Boos M., Petrovskis I., Ose V., Skrastina D., Fiedler M., Sominskaya I., Ross S., Pumpens P., Roggendorf M., Viazov S. Recombinant virus-like particles as a carrier of B- and T-cell epitopes of hepatitis C virus (HCV). *Vaccine*, 24(20):4369-77.

Pateicības

Šis darbs tika izstrādāts Proteīnu inženierijas laboratorijā, Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, Rīgā, Latvijā un Esenes Universitātes klīnikas Virusoloģijas institūta, Esenē, Vācijā laika posmā no 01.11.2002. līdz 01.08.2006. Darbs tika paveikts Latvijas Zinātnes Akadēmijas granta Nr.05.1626 ietvaros un ar Eiropas Sociālā fonda (ESF) atbalstu.

Es gribētu izteikt savu pateicību visiem kolēģiem, ar kuru palīdzību es spēju paveikt šo darbu. It īpaši es gribētu pateikt paldies sekojošiem cilvēkiem:

- Prof. P. Pumpēnam, Dr.Biol. S. Viazovam un Dr.Biol. I. Sominskai, maniem darba vadītājiem, par iespēju brīvi strādāt viņu darba grupās; par viņu nepārtrauktu zinātnisku atbalstu un atbilstošu darba apstākļu un materiālu nodrošināšanu;
- Prof. M. Rogendorfam, Esenes Virusoloģijas institūta direktoram, par viņa neizsīkstošu zinātnisku interesi par manu darbu un par kritisku iegūto rezultātu vērtēšanu;
- Y. Pietsch, T. Gross, C. Oniangue Ndza, M. Aus dem Zīpenam, Dr.Biol. G. Celinskim, Dr.Biol. A. Kraft, A. Šuman par palīdzību un draudzīgu atmosfēru Virusoloģijas Institūtā (Esene, Vācija) manas ilgas prombūtnes no mājām laikā;
- Dr.habil.Biol. V. Osei (Rīga, Latvija) par viņas izcilu elektronmikroskopijas analīzi un zinātniskajām diskusijām; Dr. K. Uhde-Holzen (Āhene, Vācija) un Dr. E. N. Šmitam (Esene, Vācija) par papildus palīdzību elektronmikroskopijas preparātu sagatavošanā;
- Dr. I. Petrovskim, Dr. A. Kazākam, Dr. D. Dreiliņai, I. Dienavai un I. Akopjānai (Rīga, Latvija) par laipnu palīdzību un padomiem mikrobioloģiskajos darbos;
- L. Jackevicai un Dr. G. Mezulei (Rīga, Latvija), Dr. R. Bartenšlāgeram (Haidelberga, Vācija), Dr. M. Mondelli (Pavija, Itālija) un Dr. D. Moradpūram (Lozanna, Šveice) par laipnu antivielu dāvinājumu;
- Dr. S. Rosam (Esene, Vācija) par laipni piedāvātajiem hroniskā hepatīta C pacientu serumiem;
- L. Kovaļevskai un J. Ozolam (Rīga, Latvija) par viņu palīdzību VLP attīrīšanas procedūras optimizācijā;
- Dr. T. Voronkovai, Dr. J. Jansonam, G. Sudmalei un citiem kolēģiem par draudzīgu darba atmosfēru LBMC Rīgā;
- Dr. Z. Šomšteinei, LBMC direktorei (Rīga, Latvija), un visam administratīvajam personālam par laipnu palīdzību darba laikā institūtā;
- Manam vīram un manai meitai par viņu pacietību, neaizvietojamu atbalstu un palīdzību kāmēr es rakstīju šo darbu.

Literatūras saraksts

- Abel K., Wang Y., Fritts L., Sanchez E., Chung E., Fitzgerald-Bocarsly P., Krieg A.M., Miller C.J. 2005. Deoxycytidyl-deoxyguanosine oligonucleotide classes A, B, and C induce distinct cytokine gene expression patterns in Rhesus monkey peripheral blood mononuclear cells and distinct alpha interferon responses in TLR9-expressing Rhesus monkey plasmacytoid dendritic cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12: 606–621.
- Alter M.J. 1996. Epidemiology of hepatitis C. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 8: 319–323.
- Alter M.J. 1997. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology*, 26: 62S–65S.
- Alter M.J. 1999. Hepatitis C virus infection in the United States. *J. Hepatol.*, 31 (Suppl. 1): 88–91.
- Alter M.J. 2002. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology*, 36: S93–S98.
- Alter H.J., Seeff L.B. 2000. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin. Liver Dis.*, 20: 17–35.
- Bassett S.E., Guerra B., Brasky K., Miskovsky E., Houghton M., Klimpel G.R., Lanford R.E. 2001. Protective immune response to hepatitis C virus in chimpanzees rechallenged following clearance of primary infection. *Hepatology*, 33: 1479–1487.
- Baumert T.F., Wellnitz S., Aono S., Satoi J., Herion D., Tilman Gerlach J., Pape G.R., Lau J.Y., Hoofnagle J.H., Blum H.E., Liang T.J. 2000. Antibodies against hepatitis C virus-like particles and viral clearance in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology*, 32: 610–617.
- Bigger C.B., Guerra B., Brasky K.M., Hubbard G., Beard M.R., Luxon B.A., Lemon S.M., Lanford R.E. 2004. Intrahepatic gene expression during chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees. *J. Virol.*, 78: 13779–13792.
- Birnbaum F., Nassal M. 1990. Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *J. Virol.*, 64: 3319–3330.
- Borisova G.P., Kalis Ia.V., Pushko P.M., Tsibinogin V.V., Loseva V.Ia. 1988. Genetically engineered mutants of the core antigen of the human hepatitis B virus preserving the ability for native self-assembly (in Russian). *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.*, 298: 1474–1478.
- Bottcher B., Wynne S.A., Crowther R.A. 1997. Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature*, 386: 88–91.
- Bowen D.G., Walker C.M. 2005. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature*, 436:946–952.
- Bowen D.G., Walker C.M. 2005. Mutational escape from CD8⁺ T cell immunity: HCV evolution, from chimpanzees to man. *J. Exp. Med.* 201: 1709–1714.

Bundule M.A., Bychko V.V., Saulitis Iu.B., Liepin'sh E.E., Borisova G.P., Petrovskii I.A., Tsibinogin V.V., Pumpen P.P., Gren E.Ia. 1990. C-terminal polyarginine tract of hepatitis B core antigen is located on the outer capsid surface (in Russian). *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.*, 312: 993-996.

Chisari F.V., Ferrari C. 1995. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.*, 13: 29-60.

Choo Q.L., Kuo G., Ralston R., Weiner A., Chien D., van Nest G., Han J., Berger K., Thudium K., Kuo C., Kansopon J., McFarland J., Tabrizi A., Ching K., Mosst B., Cummins L.B., Houghton M., Muchmore E. 1994. Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91: 1294–1298.

Clarke B.E., Newton S.E., Carroll A.R., Francis M.J., Appleyard G., Syred A.D., Highfield P.E., Rowlands D.J., Brown F. 1987. Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein. *Nature*, 330: 381-384.

Cohen B.J., Richmond J.E. 1982. Electron microscopy of hepatitis B core antigen synthesized in *E. coli*. *Nature*, 296: 677-679.

Contreras-Moreira B., Bates P.A. 2002. Domain fishing: a first step in protein comparative modelling. *Bioinformatics*, Aug;18:1141-1142.

Conway J.F., Cheng N., Zlotnick A., Wingfield P.T., Stahl S.J., Steven A.C. 1997. Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature*, 386: 91-94.

Cramp M.E., Rossol S., Chokshi S., Carucci P., Williams R., Naoumov N.V. 2000. Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 118: 346–355.

Crotta S., Stilla A., Wack A., D'Andrea A., Nuti S., D'Oro U., Mosca M., Filliponi F., Brunetto R.M., Bonino F., Abrignani S., Valiante N.M. 2002. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J. Exp. Med.*, 195: 35–41 .

Crowther R.A., Kiselev N.A., Bottcher B., Berriman J.A., Borisova G.P., Ose V., Pumpens P. 1994. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell*, 77: 943-950.

Duenas-Carrera S. 2004. DNA vaccination against hepatitis C. *Curr Opin Mol Ther*, 6 :146–150.

Encke J., Findeklee J., Geib J., Pfaff E., Stremmel W. 2005. Prophylactic and therapeutic vaccination with dendritic cells against hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol*, 142 :362–369.

Farci P., Alter H.J., Govindarajan S., Wong D.C., Engle R., Lesniewski R.R., Mushahwar I.K., Desai S.M., Miller R.H., Ogata N. 1992. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science*, 258: 135–140.

Feld J.J., Hoofnagle J.H. 2005. Mechanisms of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*, 436: 967-972.

- Forns X., Payette P.J., Ma X., Satterfield W., Eder G., Mushahwar I.K., Govindarajan S., Davis H.L., Emerson S.U., Purcell R.H., Bukh J. 2000. Vaccination of chimpanzees with plasmid DNA encoding the hepatitis C virus (HCV) envelope E2 protein modified the infection after challenge with homologous monoclonal HCV. *Hepatology*, 32: 618–625.
- Foy E., Li K., Sumpter R.Jr., Loo Y.M., Johnson C.L., Wang C., Fish P.M., Yoneyama M., Fujita T., Lemon S.M., Gale M.Jr. 2005. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102: 2986–2991.
- Gallina A., Bonelli F., Zentilin L., Rindi G., Muttini M., Milanesi G. 1989. A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. *J. Virol.*, 63: 4645–4662.
- Hatton T., Zhou S., Standring D.N. 1992. RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J. Virol.*, 66: 5232–5241.
- Hoofnagle JH, Gerety RJ, Barker LF. 1973. Antibody to hepatitis-B-virus core in man. *Lancet*, 2, 869–873.
- Hoofnagle J.H. 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*, 36: S21–S29.
- Houghton M., Abrignani S. 2005. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature*, 436:961–966.
- Inada T., Misumi Y., Seno M., Kanezaki S., Shibata Y., Oka Y., Onda H. 1989. Synthesis of hepatitis B virus e antigen in *E. coli*. *Virus Res.*, 14: 27–47.
- Inchauspe G., Feinstone S. 2003. Development of a hepatitis C virus vaccine. *Clin Liver Dis*, 7: 243–259.
- Jin B., Wang Y.R., Qiu Q., Sugauchi F., Grandinetti T., Alter J.H., Shih J.W. 2007. Induction of potent cellular immune response in mice by hepatitis C virus NS3 protein with double-stranded RNA. *Immunology*, 1–13.
- Karpenko L.I., Ivanisenko V.A., Pika I.S., Chikhaev N.A., Eroshkin A.M., Melamed N.V., Veremeiko T.A., Il'ichev A.A. 2000. Analysis of foreign epitopes inserted in HBcAg. Possible routes for solving the problem of chimeric core particle self assembly (in Russian). *Mol. Biol. (Moscow)*, 34: 223–229.
- Lai M.E., Mazzoleni A.P., Argioli F., De Virgili S., Balestrieri A., Purcell R.H., Cao A., Farci P. 1994. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet*, 343: 388–390.
- Lanford R.E., Guerra B., Chavez D., Bigger C., Brasky K.M., Wang X.H., Ray S.C., Thomas D.L. 2004. Cross-genotype immunity to hepatitis C virus. *J. Virol.*, 78: 1575–1581.
- Lechner F., Jegerlehner A., Tissot A.C., Maurer P., Sebbel P., Renner W.A., Jennings G.T., Bachmann M.F. 2002. Virus-like particles as a modular system for novel vaccines. *Intervirology*, 45: 212–217.
- Li K., Foy E., Ferreon J.C., Nakamura M., Ferreon A.C., Ikeda M., Ray S.C., Gale M.Jr., Lemon S.M. 2005. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102: 2992–2997.

- Lindenbach B.D., Evans M.J., Syder A.J., Wolk B., Tellinghuisen T.L., Liu C.C., Maruyama T., Hynes R.O., Burton D.R., McKeating J.A., Rice C.M. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, 309: 623–626.
- Lohmann V., Koch J.O., Bartenschlager R. 1996. Processing pathways of the hepatitis C virus proteins. *J. Hepatol.*, 24: 11–19.
- McKeating J.A., Zhang L.Q., Logvinoff C., Flint M., Zhang J., Yu J., Butera D., Ho D.D., Dustin L.B., Rice C.M., Balfe P. 2004. Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81-dependent manner. *J. Virol.*, 78: 8496–8505.
- Mehta S.H., Cox A., Hoover D.R., Wang X.H., Mao Q., Ray S., Strathdee S.A., Vlahov D., Thomas D.L. 2002. Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet*, 359: 1478–1483.
- Meyer-Olson D., Shoukry N.H., Brady K.W., Kim H., Olson D.P., Hartman K., Shintani A.K., Walker C.M., Kalams S.A. 2004. Limited T cell receptor diversity of HCV-specific T cell responses is associated with CTL escape. *J. Exp. Med.*, 200: 307–319.
- Mihailova M., Fiedler M., Boos M., Petrovskis I., Sominskaya I., Roggendorf M., Viazov S., Pumpens P. 2006. Preparation of hepatitis C virus structural and non-structural protein fragments and studies of their immunogenicity. *Protein Expr Purif.*, Nov;50(1): 43-48.
- Milich D.R., McLachlan A. 1986. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen. *Science*, 234: 1398-1401.
- Milich D.R., McLachlan A., Thornton G.B., Hughes J.L. 1987. Antibody production to the nucleocapsid and envelope of the hepatitis B virus primed by a single synthetic T cell site. *Nature*, 329: 547-549.
- Milich D.R., Peterson D.L., Zheng J., Hughes J.L., Wirtz R., Schodel F. 1995. The hepatitis nucleocapsid as a vaccine carrier moiety. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 754: 187-201.
- Milich D.R., Schodel F., Hughes J.L., Jones J.E., Peterson D.L. 1997. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *J. Virol.*, 71: 2192-2201.
- Milich D.R., Chen M., Schodel F., Peterson D.L., Jones J.E., Hughes J.L. 1997. Role of B cells in antigen presentation of the hepatitis B core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94: 14648-14653.
- Mondelli M., Vergani G.M., Alberti A., Vergani D., Portmann B., Eddleston A.L., Williams R. 1982. Specificity of T lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection: evidence that T cells are directed against HBV core antigen expressed on hepatocytes. *J. Immunol.*, 129: 2773-2778.

- Mondelli M.U., Cerino A., Segagni L., Meola A., Cividini A., Silini E., Nicosia A. 2001. Hypervariable region 1 of hepatitis C virus: immunological decoy or biologically relevant domain? *Antiviral Res.*, 52: 153–159.
- Moradpour D., Brass V., Bieck E., Friebe P., Gosert R., Blum H.E., Bartenschlager R., Penin F., Lohmann V. 2004. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.*, 78: 13278–13284.
- Murray K., Shiao A.L. 1999. The core antigen of hepatitis B virus as a carrier for immunogenic peptides. *Biol. Chem.*, 380: 277–283.
- Nelson D.R., Marousis C.G., Ohno T., Davis G.L., Lau J.Y. 1998. Intrahepatic hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte activity and response to interferon alpha therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 28: 225–230.
- Neumann A.U., Lam N.P., Dahari H., Gretch D.R., Wiley T.E., Layden T.J., Perelson A.S. 1998. Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon- α therapy. *Science*, 282: 103–107.
- Neumann-Haefelin C., Blum H.E., Chisari F.V., Thimme R. 2005. T cell response in hepatitis C virus infection. *J. Clin. Virol.*, 32: 75–85.
- Nevens F., Roskams T., Van Vlierberghe H., Horsmans Y., Sprengers D., Elewaut A., Desmet V., Leroux-Roels G., Quinaux E., Depla E., Dincq S., Vander Stichele C., Maertens G., Hulstaert F. 2003. A pilot study of therapeutic vaccination with envelope protein E1 in 35 patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 38: 1289–1296.
- Newton S.E. 1987. New approaches to FMDV antigen presentation using vaccinia virus. In: Chanock R.M. (eds) *Vaccines 87. Modern Approaches to New Vaccines: Prevention of AIDS and Other Viral, Bacterial, and Parasitic Diseases*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 12–21.
- Oliveira G.A., Wetzel K., Calvo-Calle J.M., Nussenzweig R., Schmidt A., Birkett A., Dubovsky F., Tierney E., Gleiter C.H., Boehmer G., Luty A.J., Ramharter M., Thornton G.B., Kremsner P.G., Nardin E.H. 2005. Safety and enhanced immunogenicity of a hepatitis B core particle *Plasmodium falciparum* malaria vaccine formulated in adjuvant Montanide ISA 720 in a phase I trial. *Infect. Immun.*, 73: 3587–3597.
- Oxman M.N., Levin M.J., Johnson G.R., Schmader K.E., Straus S.E., Gelb L.D., Arbeit R.D., Simberkoff M.S., Gershon A.A., Davis L.E., Weinberg A., Boardman K.D., Williams H.M., Zhang J.H., Peduzzi P.N., Beisel C.E., Morrison V.A., Guatelli J.C., Brooks P.A., Kauffman C.A., Pachucki C.T., Neuzil K.M., Betts R.F., Wright P.F., Griffin M.R., Brunell P., Soto N.E., Marques A.R., Keay S.K., Goodman R.P., Cotton D.J., Gnann J.W.Jr., Loutit J., Holodniy M., Keitel W.A., Crawford G.E., Yeh S.S., Lobo Z., Toney J.F., Greenberg R.N., Keller P.M., Harbecke R., Hayward A.R., Irwin M.R., Kyriakides T.C., Chan C.Y., Chan I.S., Wang W.W., Annunziato P.W., Silber J.L.; Shingles Prevention Study Group. 2005 A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *N. Engl. J. Med.*, 352: 2271–2284.
- Penin F., Dubuisson J., Rey F.A., Moradpour D., Pawlotsky J.M. 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*, 39: 5–19.

- Pearse M.J., Drane D. 2005. ISCOMATRIX adjuvant for antigen delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57: 465–474.
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. 2004. UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.*, 25: 1605-1612.
- Pileri P., Uematsu Y., Campagnoli S., Galli G., Falugi F., Petracca R., Weiner A.J., Houghton M., Rosa D., Grandi G., Abrignani S. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 282: 938–941.
- Polakos N.K., Drane D., Cox J., Ng P., Selby M.J., Chien D., O'Hagan D.T., Houghton M., Paliard X. 2001. Characterization of hepatitis C virus core-specific immune responses primed in rhesus macaques by a non-classical ISCOM vaccine. *J. Immunol.*, 166: 3589–3598.
- Puig M., Major M.E., Mihalik K., Feinstone S.M. 2004. Immunization of chimpanzees with an envelope protein-based vaccine enhances specific humoral and cellular immune responses that delay hepatitis C virus infection. *Vaccine*, 22: 991–1000.
- Pumpens P., Borisova G.P., Crowther R.A., Grens E. 1995. Hepatitis B virus core particles as epitope carriers. *Intervirology*, 38: 63-74.
- Pumpens P., Grens E. 1999. Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development. *FEBS Lett.*, 442: 1-6.
- Pumpens P., Grens E. 2001. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology*, 44: 98–114.
- Ralston R., Thudium K., Berger K., Kuo C., Gervase B., Hall J., Selby M., Kuo G., Houghton M., Choo Q.L. 1993. Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.*, 67: 6753–6761.
- Rehermann B., Ferrari C., Pasquinelli C., Chisari F.V. 1996. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat. Med.*, 2: 1104-1108.
- Rehermann B., Nascimbeni M. 2005. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.*, 5: 215–229.
- Rollier C., Depla E., Drexhage J.A., Verschoor E.J., Verstrepen B.E., Fatmi A., Brinster C., Fournillier A., Whelan J.A., Whelan M., Jacobs D., Maertens G., Inchauspe G., Heeney J.L. 2004. Control of heterologous hepatitis C virus infection in chimpanzees is associated with the quality of vaccine induced peripheral T-helper immune response. *J. Virol.*, 78: 187–196.

- Roohvand F., Aghasadeghi M., Sadat S.M., Budkowska A., Khabiri A. 2007. HCV core protein immunization with Montanide/CpG elicits strong Th1/Th2 and long-lived CTL responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354: 641-649.
- Rosa D., Campagnoli S., Moretto C., Guenzi E., Cousens L., Chin M., Dong C., Weiner A.J., Lau J.Y., Choo Q.L., Chien D., Pileri P., Houghton M., Abrignani S. 1996. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 93: 1759–1763.
- Saadeh S., Davis G.L. 2004. The evolving treatment of chronic hepatitis C: where we stand a decade out. *Cleveland Clin. J. Med.*, 71(Suppl. 3): S3–S7.
- Samuel C.E. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14: 778–809.
- Schodel F., Peterson D., Hughes J., Wirtz R., Milich D. 1996. Hybrid hepatitis B virus core antigen as a vaccine carrier moiety: I. Presentation of foreign epitopes. *J. Biotechnol.*, 44: 91-96.
- Seeff L.B. 2002. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*, 36: S35–S46.
- Seifer M., Standring D.N. 1995. Assembly and antigenicity of hepatitis B virus core particles. *Intervirology*, 38: 47-62.
- Shoukry N.H., Cawthon A.G., Walker C.M. 2004. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu. Rev. Microbiol.*, 58: 391–424.
- Simmonds P. 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus—15 years on. *J. Gen. Virol.*, 85: 3173–3188.
- Simmonds P., Bukh J., Combet C., Deleage G., Enomoto N., Feinstone S., Halfon P., Inchauspe G., Kuiken C., Maertens G., Mizokami M., Murphy D.G., Okamoto H., Pawlotsky J.M., Penin F., Sablon E., Shin-I T., Stuyver L.J., Thiel H.J., Viazov S., Weiner A.J., Widell A. 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 42: 962–973.
- Spaulding A., Greene C., Davidson K., Schneidermann M., Rich J. 1999. Hepatitis C in state correctional facilities. *Prev. Med.*, 28: 92–100.
- Sulkowski M.S., Mast E.E., Seeff L.B., Thomas D.L. 2000. Hepatitis C virus infection as an opportunistic disease in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.*, 30(Suppl.1): S77–S84.
- Tabor E., Purcell R.H., Gerety R.J. 1983. Primate animal models and titered inocula for the study of human hepatitis A, hepatitis B, and non-A, non-B hepatitis. *J. Med. Primatol.*, 12: 305-318.

- Torresi J., Bharadwaj M., Jackson D.C., Gowans E.J. 2004. Neutralising antibody, CTL and dendritic cell responses to hepatitis C virus: a preventive vaccine strategy. *Curr. Drug Targets*, 5: 41-56.
- Tseng C.T., Klimpel G.R. 2002. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J. Exp. Med.*, 195: 43–49.
- Ulrich R., Borisova G.P., Gren E., Berzin I., Pumpen P., Eckert R., Ose V., Siakkou H., Gren E.J., von Baehr R. 1992. Immunogenicity of recombinant core particles of hepatitis B virus containing epitopes of human immunodeficiency virus 1 core antigen. *Arch. Virol.*, 126: 321-328.
- Ulrich R., Nassal M., Meisel H., Kruger D.H. 1998. Core particles of hepatitis B virus as carrier for foreign epitopes. *Adv. Virus. Res.*, 50: 141–182.
- Vrolijk J.M., Kwekkeboom J., Janssen H.L., Hansen B.E., Zondervan P.E., Osterhaus A.D., Schalm S.W., Haagmans B.L. 2003. Pretreatment intrahepatic CD8⁺ cell count correlates with virological response to antiviral therapy in chronic hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.*, 188: 1528–1532.
- Wakita T., Pietschmann T., Kato T., Date T., Miyamoto M., Zhao Z., Murthy K., Habermann A., Krausslich H.G., Mizokami M., Bartenschlager R., Liang T.J. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Med.*, 11: 791–796.
- Weiner A.J., Paliard X., Selby M.J., Medina-Selby A., Coit D., Nguyen S., Kansopon J., Arian C.L., Ng P., Tucker J., Lee C.T., Polakos N.K., Han J., Wong S., Lu H.H., Rosenberg S., Brasky K.M., Chien D., Kuo G., Houghton M. 2001. Intrahepatic genetic inoculation of hepatitis C virus RNA confers crossprotective immunity. *J. Virol.*, 75: 7142–7148.
- Wieland S.F., Chisari F.V. 2005. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C. *J. Virol.*, 79: 9369–9380.
- Wynne S.A., Crowther R.A., Leslie A.G. 1999. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol. Cell*, 3: 771-780.
- Yamaguchi M., Hirano T., Sugahara K., Mizokami H., Araki M., Matsubara K. 1988. Electron microscopy of hepatitis B virus core antigen expressing yeast cells by freeze-substitution fixation. *Eur. J. Cell. Biol.*, 47: 138-143.
- Yoneyama M., Kikuchi M., Natsukawa T., Shinobu N., Imaizumi T., Miyagishi M., Taira K., Akira S., Fujita T. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunol.*, 5: 730–737.
- Zhong J., Gastaminza P., Cheng G., Kapadia S., Kato T., Burton D.R., Wieland S.F., Uprichard S.L., Wakita T., Chisari F.V. 2005. Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102: 9294–9299.
- Wizemann H., von Brunn A. 1999. Purification of E. coli-expressed HIS-tagged hepatitis B core antigen by Ni²⁺ -chelate affinity chromatography. *J. Virol. Methods*, 77: 189-197.