

ХИМЕРНЫЙ БЕЛОК НВсAg, НЕСУЩИЙ МИМЕТИК ЭПИТОПА, УЗНАВАЕМОГО МОНОКЛОНАЛЬНЫМ АНТИТЕЛОМ VRC01

А.П. Рудометов

аспирант, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (п. Кольцово, г. Новосибирск)
E-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru

А.Н. Чикаев

к.б.н., Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН (г. Новосибирск)

Н.Б. Андреева

аспирант, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (п. Кольцово, г. Новосибирск)

Н.С. Щербакова

науч. сотрудник, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (п. Кольцово, г. Новосибирск)

Л.Р. Лебедев

д.м.н., Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (п. Кольцово, г. Новосибирск)

О.Н. Каплина

ст. науч. сотрудник, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (п. Кольцово, г. Новосибирск)

А.А. Ильичев

д.б.н., Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (п. Кольцово, г. Новосибирск)

Л.И. Карпенко

д.б.н., Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (п. Кольцово, г. Новосибирск)

Представлено получение и анализ иммуногенных свойств рекомбинантного корового белка вируса гепатита В (НВсAg), несущего линейный миметик эпитопа, узнаваемого широконейтрализующим ВИЧ-1 моноклональным антителом VRC01, с целью создания ВИЧ-иммуногена.

Ключевые слова: ВИЧ-1, ВИЧ-иммуногены, широконейтрализующие антитела, миметик эпитопа, химерный НВсAg.

Для цитирования: Рудометов А.П., Чикаев А.Н., Андреева Н.Б., Щербакова Н.С., Лебедев Л.Р., Каплина О.Н., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Химерный белок НВсAg, несущий миметик эпитопа, узнаваемого моноклональным антителом VRC01. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(4):46–51. DOI: 10.29296/25877313-2018-04-08

Эпидемия ВИЧ-1 является одной из самых острых проблем современного здравоохранения. Несмотря на десятилетия исследований, до сих пор не удалось создать эффективную вакцину против ВИЧ-1. Для получения такой вакцины было испробовано множество подходов, включая использование инактивированных форм вируса, субъединичных вакцин, ДНК-вакцин, а также препаратов на основе рекомбинантных вирусных и бактериальных векторов [1]. Тем не менее ни одна из кандидатных вакцин не продемонстрировала достаточный уровень эффективности, за исключением относительно успешных клинических испытаний RV144, которые показали, что использованный для вакцинации препарат обеспечивал хотя и скромный, но достоверный уровень защиты, составивший 31,2% [2]. Результаты испытаний RV144 продемонстрировали возможность создания ВИЧ-вакцины и подтолкнули исследователей

к разработке новых подходов дизайна ВИЧ-иммуногенов [1].

Открытие широконейтрализующих антител (bnAbs – broadly neutralizing antibodies), обладающих нейтрализующей активностью в отношении большинства первичных изолятов ВИЧ-1, прибавило оптимизма разработчикам вакцины. Создание иммуногена, способного индуцировать такие антитела, по мнению ряда авторов, может обеспечить защиту против ВИЧ-1 и, таким образом, способствовать созданию эффективной вакцины против данного вируса [1, 3].

При конструировании иммуногенов, направленных на индукцию bnAbs, одной из наиболее сложных задач является адекватное воспроизведение конформации эпитопов поверхностных гликопротеинов, которую трудно смоделировать в искусственном иммуногене. Возможное решение проблемы – использование линейных пептидов

имитаторов конформационных антигенных детерминант ВИЧ-1, отобранных методами комбинаторной биологии, например с использованием техники фагового дисплея [4, 5].

В данной работе для создания иммуногена использовались отобранные ранее с помощью технологии фагового дисплея пептиды-имитаторы конформационного эпитопа, узнаваемого широконейтрализующим ВИЧ-1 моноклональным антителом VRC01 (МКА VRC01). Белком-носителем эпитопов служил коровий белок вируса гепатита В (НВсAg).

Цель исследования – получение и характеристика химерного белка НВсAg, экспонирующего линейный пептид-имитатор конформационного эпитопа, узнаваемого МКА VRC01.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Конструирование рекомбинантной ДНК НВсAg. В качестве вектора, несущего ген НВсAg, использовали полученную ранее плазмиду pUC/НВсAg [6]. Конструирование плазмиды, несущей ген НВсAg со встроенным 7-мерным пептидом-имитатором МКА VRC01 (mimicVRC01), проводили путем клонирования синтетических олигонуклеотидов по уникальному сайту рестрикции *Xho* I. Структура целевой плазмиды была подтверждена рестрикционным анализом и секвенированием.

Выделение рекомбинантного антигена на основе НВсAg. Для наработки белка НВсAg-mimicVRC01 клетки *E. coli* JM103, трансформированные конструкцией pUC/НВсAg-mimicVRC01, культивировали в среде YТ×2 до $OD_{600}=1$, после этого добавляли индуктор изопропил-β-D-1-тио-галактопиранозид и продолжали культивирование в течение 4 ч. Полученную биомассу суспендировали в натрий-фосфатном буфере (PBS, pH 8) и разрушали клетки с использованием ультразвукового гомогенизатора. Тельца включения отделяли центрифугированием при 16000 об/мин в течение 15 мин при 4 °С. Целевой белок из телец включения экстрагировали в буфере на основе PBS, содержащем 8 М мочевины. После этого проводили рефолдинг целевого белка диализом против пяти смен PBS с понижающейся концентрацией мочевины (6; 4; 2; 1; 0 М мочевины). Для очистки использовали гель фильтрацию на сефарозе CL-6В. Чистоту целевого белка и его гомогенность контролировали с помощью SDS-электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле.

Вестерн-блот анализ. Вестерн-блот анализ проводили по стандартной методике. Иммунодетекцию осуществляли с использованием первичных анти-НВсAg моноклональных мышинных антител («Вектор-Бест», Новосибирск). Связывание специфического антитела визуализировали с помощью меченых щелочной фосфатазой антител кролика против IgG мыши (Sigma) и хромогенного субстрата BCIP/NBT.

Иммунизация. Для иммунизации использованы мыши линии BALB/c (генотип H-2^d) массой 12–15 г (самцы), полученные из вивария ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (п. Кольцово, Россия). Животные были распределены на две группы, по 10 особей в каждой. Первой группе внутримышечно вводили очищенный рекомбинантный белок НВсAg-mimicVRC01, трехкратно, с интервалом в одну неделю. Вторая группа мышей служила в качестве отрицательного контроля, животным вводили препарат НВсAg по схеме, описанной выше. На 7-й день после последней иммунизации производили забор образцов крови, из которых получали сыворотку и анализировали на наличие специфических антител. Для анализа использовали суммарный пул иммунных сывороток.

Все работы с животными проводили строго по «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животные содержались на стандартном рационе с достаточным количеством воды. План эксперимента утвержден биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Иммуноферментный анализ. Белок НВсAg и НВсAg-mimicVRC01 сорбировали на 96-луночные планшеты, блокировали BSA, затем вносили сыворотки, полученные от иммунизированных животных. Далее вносили конъюгат – антитела кролика против IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma) и субстрат (ТМВ). Измерение оптической плотности (ОП) проводили с помощью ИФА-ридера при длине волны OD_{450} .

Реакция вируснейтрализации. Наличие вируснейтрализующей активности сывороток определяли путем постановки реакции нейтрализации с использованием рекомбинантного вируса на основе штамма ВИЧ-1 92BR025 и клеток мишеней U87.CD4.CCR5. Клетки-мишени содержат рецептор CD4 и корецептор CCR5, а также репортерный ген люциферазы *Renilla*, который активируется в результате инфицирования ВИЧ-1. Экспрессия активированного гена люциферазы в инфицированных клетках детектируется с помощью люмино-

метра, при этом интенсивность люминесценции пропорциональна уровню инфекции, а подавление люминесценции соответствует нейтрализации ВИЧ-инфекции [7]. Среднее значение IC_{50} рассчитывали с помощью программы GraphPad Prism 6.0 по результатам трех параллельных измерений и выражали в концентрации антител (мкг/мл), при которой происходит снижение люминесцентного сигнала на 50 %. Процент нейтрализации вычисляли как отношение между значениями люминесцентных единиц опытных лунок (сыворотка+псевдовирол+клетки) и контролем вируса (псевдовирол+клетки).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Задачей данной работы являлось конструирование ВИЧ-иммуногена, способного индуцировать вируснейтрализующие антитела, обладающие свойствами МКА VRC01. Это уникальное моноклональное антитело способно нейтрализовать примерно 91% различных изолятов ВИЧ-1 [8]. Нативный эпитоп МКА VRC01 перекрывается с областью CD4bs gp120 ВИЧ-1 и сформирован дискретным набором аминокислотных остатков, т.е. является конформационным. Поэтому в качестве антигенной детерминанты использован имитатор эпитопа, узнаваемого МКА VRC01. Ранее с помощью аффинной селекции из фаговой пептидной библиотеки были отобраны клоны, которые экспонируют специфично связывающиеся с МКА VRC01 пептиды [9]. Показано, что пептид SWTLLGY эффективно связывался с МКА VRC01, а также конкурировал с ВИЧ-1 за связывание с данным антителом. [9]. Недостатком нитчатого бактериофага M13, если рассматривать его с точки зрения белка-носителя, является то, что он несет всего несколько копий чужеродного пептида в составе фагового белка РIII,

и при иммунизации основная часть антител нарабатывается против белков бактериофага.

Одной из перспективных систем презентации чужеродных эпитопов для создания высокоиммуногенных вакцин является HBcAg [10]. HBcAg состоит в среднем из 200 идентичных белковых субъединиц размером 21 кДа, которые обладают способностью самоорганизовываться в коровую частицу. Стоит также отметить особенности HBcAg, удобные для биотехнологических работ: высокий уровень продукции гена HBcAg и способность к самосборке в коровые частицы природной формы в различных системах экспрессии [10].

В данной работе использован HBcAg в качестве носителя пептида SWTLLGY (имитатора эпитопа, узнаваемого МКА VRC01) и оценена иммуногенность данного пептида вне контекста бактериофага.

В качестве вектора, несущего ген HBcAg, была использована плазида рUHbс. Встройки олигонуклеотидов, кодирующих пептиды-имитаторы МКА VRC01, проводили в область, соответствующую 81 а.о. HBcAg (район главной антигенной детерминанты кора – e1) (рис. 1).

Полученная рекомбинантная плазида обозначена рUC/HBcAg-mimicVRC01. Выявлено, что в клетках *E. coli* JM103, трансформированных рUC/HBcAg-mimicVRC01, синтезируется белок с электрофоретической подвижностью, соответствующей теоретически рассчитанной. Детекцию в клетках *E. coli* рекомбинантного белка HBcAg-mimicVRC01 проводили с помощью вестерн-блот анализа с использованием МКА к HBcAg (рис. 2). Оказалось, что МКА одинаково эффективно узнают как исходный HBcAg, так и HBcAg-mimicVRC01, и встройка пептида SWTLLGY не нарушает антигенные свойства белка-носителя.



Рис 1. Схема клонирования олигонуклеотидов, кодирующих имитатор эпитопа, узнаваемого МКА VRC01, в составе плазмидной ДНК рUC/HBcAg

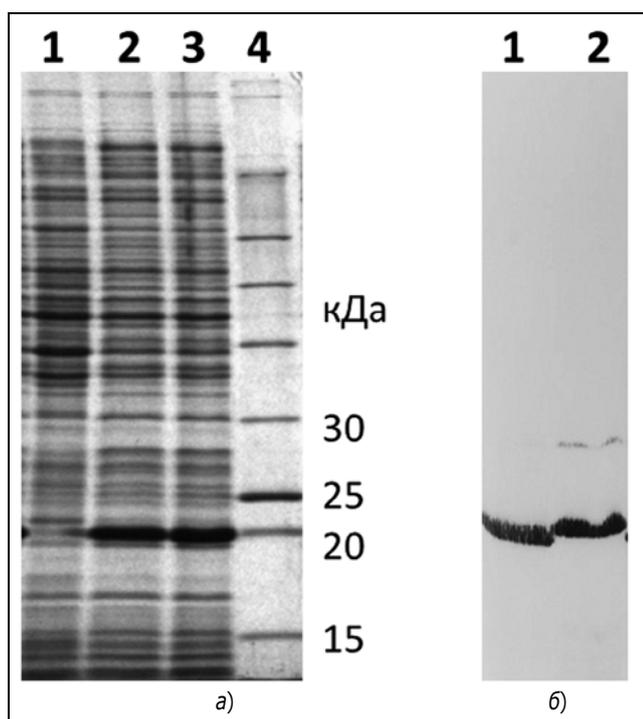


Рис 2. Результаты детекции: а - электрофореграмма лизатов клеток *E. coli* JM103 в 12% ПААГ (1 – отрицательный контроль, культура *E. coli* JM103 без плазмиды; 2 – лизат клеток *E. coli* JM103/pUC/HBcAg-mimicVRC01; 3 – лизат клеток *E. coli* JM103/pUC/HBcAg; 4 – маркер молекулярной массы); б - вестерн-блот белков после разделения в 12% ПААГ (1 - *E. coli* JM103/pUC/HBcAg, 2 – *E. coli* JM103/pUC/HBcAg-mimicVRC01)

Установлено, что рекомбинантный белок HBcAg-mimicVRC01 находится в тельцах включения, поэтому была использована схема очистки, включающая: извлечение и отмывку телец включения, экстракцию в раствор мочевины; рефолдинг и последующую гель-фильтрацию на колонке с

сефарозой CL-6B (предел эксклюзии 10^6 Да). Показано, что белки HBcAg и HBcAg-mimicVRC01 при гель-фильтрации выходят из колонки в свободном объеме. Это позволяет предположить, что исследуемые белки формируют коровые частицы.

В результате очистки с помощью гель-фильтрации получены электрофоретически гомогенные препараты белков HBcAg и HBcAg-mimicVRC01, пригодные для иммунизации лабораторных животных.

Очищенными препаратами белков были иммунизированы мыши линии BALB/c. С помощью иммуноферментного анализа установлено, что в сыворотках иммунизированных животных выявляются специфические антитела к рекомбинантным белкам HBcAg и HBcAg-mimicVRC01. Титр иммунных сывороток не менее 1:300000.

Для оценки вируснейтрализующей активности из сывороток иммунизированных животных были выделены фракции IgG, которые анализировали путем постановки реакции нейтрализации с использованием рекомбинантного вируса ВИЧ-1 92BR025. Результаты нейтрализующего анализа показали, что IgG из сывороток животных, иммунизированных белком HBcAg-mimicVRC01, обладают способностью нейтрализовать рекомбинантный вирус 92BR025. При этом сыворотки животных из контрольной группы (иммунизированных HBcAg) не проявляют подобной нейтрализующей активности (рис. 3).

Однако для утверждения того, что в результате иммунизации HBcAg-mimicVRC01 образуются VRC01-подобные антитела, необходим анализ сывороток на расширенной панели псевдовирусов, что будет сделано в дальнейшем.

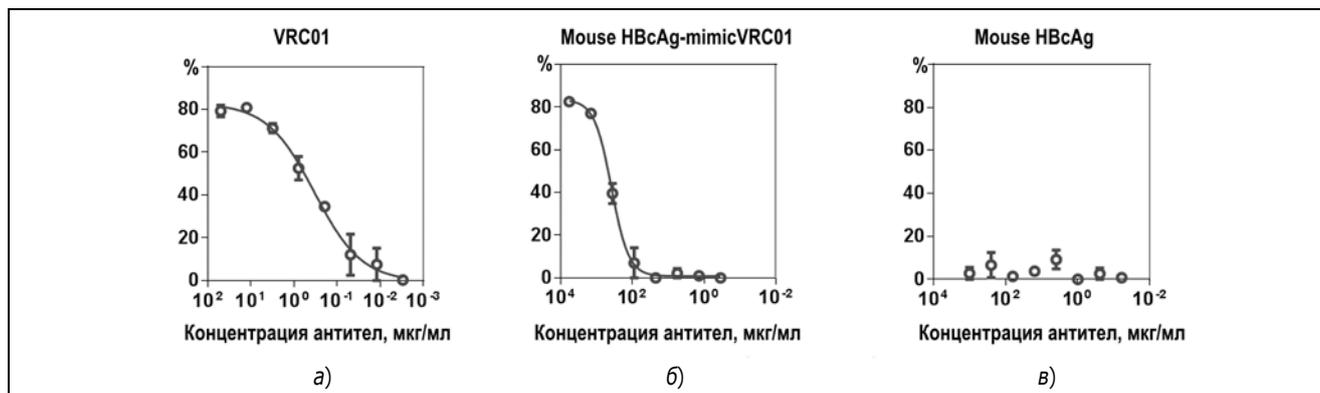


Рис. 3. Нейтрализующая активность IgGs, выделенных из сывороток иммунизированных животных, в отношении рекомбинантного ВИЧ-1 92BR025: а - результаты нейтрализации вируса МКА VRC01, ($IC_{50} = 1,58$ мкг/мл) – положительный контроль; б – результаты нейтрализации вируса выделенными из сывороток животных IgGs, иммунизированных HBcAg-mimicVRC01 ($IC_{50} = 487$ мкг/мл); в - результаты нейтрализации вируса IgGs, выделенными из сывороток животных, иммунизированных HBcAg (отрицательный контроль)

ВЫВОДЫ

1. Сконструирован химерный белок HBcAg-mimicVRC01, экспонирующий линейный пептид-имитатор конформационного эпитопа, узнаваемого МКА VRC01. При иммунизации лабораторных животных HBcAg-mimicVRC01 стимулирует синтез антител, способных нейтрализовать рекомбинантный ВИЧ-1 92BR025.
2. Пептид SWTLLGY – имитатор эпитопа, узнаваемого МКА VRC01, способен индуцировать биосинтез вируснейтрализующих антител не только в контексте бактериофага M13, но и находясь в составе другого белка-носителя – HBcAg.
3. Полученный рекомбинантный белок может рассматриваться как перспективный компонент при разработке вакцин против ВИЧ-1.

Работа выполнена при поддержке РФФ 14-14-00660.

ЛИТЕРАТУРА

1. Haynes B.F. New approaches to HIV vaccine development // Current Opinion in Immunology. 2015. № 35. P. 39–47.
2. Rerks-Ngarm S., Pitisuttithum P., Nitayaphan S., et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand // New England Journal of Medicine. 2009. № 361. P. 2209–2220.
3. Shcherbakov D.N., Bakulina A.Y., Karpenko L.I., Ilyichev A.A. Broadly Neutralizing Antibodies against HIV-1 As a Novel Aspect of the Immune Response // Acta Naturae. 2015. V. 7. № 4. P. 11–21.
4. Karpenko L.I., Scherbakova N.S., Chikaev A.N., et al. Polypeptide protein incorporated the HIV-1 mimotope recognized by monoclonal antibody 2G12 // Molecular Immunology. 2012. № 50. P. 193–199.
5. Shcherbakova N.S., Shcherbakov D.N., Bakulina A.Y., et al. Artificial polypeptide HIV-1 immunogen containing mimotope of 2F5 epitope // Protein & Peptides Letters. 2016. № 23. P. 159–168.
6. Веремейко Т.А., Лебедев Л.П., Чикаев Н.А. и др. Гуморальный иммунный ответ у мышей линии BALB/c, иммунизированных химерными белками HBcAg, несущими эпитопы поверхностного белка вируса гепатита В // Вопросы вирусологии. 2007. № 1. С. 40–45.
7. Medina-Ramírez M., Sañchez-Merino V., Sañchez-Palomino S., et al. Broadly Cross-Neutralizing Antibodies in HIV-1 Patients with Undetectable Viremia // Journal of virology. 2011. № 85. P. 5804–5813.
8. Zhou T., Georgiev I., Wu X., et al. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01 // Science. 2010. № 329. P. 811–817.
9. Chikaev A.N., Bakulina A.Y., Burdick R.C., et al. Selection of peptide mimics of HIV-1 epitope recognized by neutralizing antibody VRC01 // PloS One. 2015. № 10. P. 1–13.
10. Pumpens P., Grens E. The true story and advantages of the famous Hepatitis B virus core particles: Outlook 2016 // Molecular Biology. 2016. № 50. P. 489–509.

Поступила 5 декабря 2017 г.

CHIMERIC PROTEIN HBcAg CONTAINING THE EPITOPE MIMETIC RECOGNIZED BY MONOCLONAL ANTIBODY VRC01

© Authors, 2018

A.P. Rudometov

Post-graduate Student, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor (Koltsovo, Novosibirsk)
E-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru

A.N. Chikaev

Ph.D. (Biol.), Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Novosibirsk)

N.B. Andreeva

Post-graduate Student, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor (Koltsovo, Novosibirsk)

N.S. Shcherbakova

Research Scientist, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor (Koltsovo, Novosibirsk)

L.R. Lebedev

Dr.Sc. (Med.), State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor (Koltsovo, Novosibirsk)

O.N. Kaplina

Senior Research Scientist, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor (Koltsovo, Novosibirsk)

A.A. Ilyichev

Dr.Sc. (Biol.), State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor (Koltsovo, Novosibirsk)

L.I. Karpenko

Dr.Sc. (Biol.), State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor (Koltsovo, Novosibirsk)

The HIV-1 epidemic is one of the most acute problems of the modern healthcare. The discovery of broadly neutralizing antibodies (bnAbs) which possesses neutralizing activity against most primary isolates of HIV-1, has added an optimism to the vaccine researchers. According to several authors, the design of an immunogen capable of inducing such antibodies can provide protection against the wide genetic diversity of HIV-1 and thus contribute to the development of an effective vaccine against this virus.

The aim of this work was the construction of an HIV-immunogen capable of inducing virus-neutralizing antibodies having the properties of bnAbs VRC01. This unique monoclonal antibody can neutralize about 91% of the different HIV-1 isolates.

HBcAg is one of the promising systems for the presentation of foreign epitopes (peptides) for the development of highly immunogenic vaccines. In this work, HBcAg was used as a carrier of the SWTLLGY peptide (an epitope mimic recognized by the monoclonal antibody VRC01, previously selected using a phage display library).

The recombinant plasmid pUC/HBcAg-mimicVRC01 was obtained; it contained the sequence HBcAg, with the inserted sequence encoding the SWTLLGY peptide in the region of the main antigenic determinant of the core. BALB/c mice were immunized with purified protein preparations. Using the ELISA it was shown that sera from immunized animals contained antibodies that specifically recognized the recombinant protein HBcAg-mimicVRC01.

IgG fractions were isolated to assess the viral neutralizing activity from the sera of immunized animals. Neutralizing activity of IgGs was analyzed using the recombinant HIV-1 virus 92BR025. The results of neutralizing analysis showed that IgGs from sera of animals, immunized with HBcAg-mimicVRC01 protein, can neutralize the recombinant 92BR025 virus.

Key words: HIV-1, HIV-immunogens, broadly neutralizing antibodies, epitope mimetic, chimeric HBcAg.

For citation: Rudometov A.P., Chikaev A.N., Andreeva N.B., Shcherbakova N.S., Lebedev L.R., Kaplina O.N., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. Chimeric protein HBcAg containing the epitope mimetic recognized by monoclonal antibody VRC01. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2018; 21(4):46–51. DOI: 10.29296/25877313-2018-04-08

REFERENCES

- Haynes B.F. New approaches to HIV vaccine development // Current Opinion in Immunology. 2015. № 35. P. 39–47.
- Rerks-Ngarm S., Pitisuttithum P., Nitayaphan S., et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand // New England Journal of Medicine. 2009. № 361. P. 2209–2220.
- Shcherbakov D.N., Bakulina A.Y., Karpenko L.I., Ilyichev A.A. Broadly Neutralizing Antibodies against HIV-1 As a Novel Aspect of the Immune Response // Acta Naturae. 2015. V. 7. № 4. P. 11–21.
- Karpenko L.I., Scherbakova N.S., Chikaev A.N., et al. Polyepitope protein incorporated the HIV-1 mimotope recognized by monoclonal antibody 2G12 // Molecular Immunology. 2012. № 50. P. 193–199.
- Shcherbakova N.S., Shcherbakov D.N., Bakulina A.Y., et al. Artificial polyepitope HIV-1 immunogen containing mimotope of 2F5 epitope // Protein & Peptides Letters. 2016. № 23. P. 159–168.
- Veremejko T.A., Lebedev L.R., Chikaev N.A. i dr. Gumoral'nyj immunnyj otvet u myshej linii BALB/c, immunizirovannyh himernymi belkami HBcAg, nesushhimi jepitopy poverhnostnogo belka virusa gepatita V // Voprosy virusologii. 2007. № 1. S. 40–45.
- Medina-Ramirez M., Sa ´nchez-Merino V., Sa ´nchez-Palomino S., et al. Broadly Cross-Neutralizing Antibodies in HIV-1 Patients with Undetectable Viremia // Journal of virology. 2011; № 85. P. 5804–5813.
- Zhou T., Georgiev I., Wu X., et al. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01 // Science. 2010. № 329. P. 811–817.
- Chikaev A.N., Bakulina A.Y., Burdick R.C., et al. Selection of peptide mimics of HIV-1 epitope recognized by neutralizing antibody VRC01 // PloS One. 2015. № 10. P. 1–13.
- Pumpens P., Grens E. The true story and advantages of the famous Hepatitis B virus core particles: Outlook 2016 // Molecular Biology. 2016. № 50. P. 489–509.



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
**«Всероссийский научно-исследовательский институт
 лекарственных и ароматических растений»**
 приглашает к сотрудничеству
 фармпроизводителей и сельхозпредприятия
 для совместного продвижения наших научных разработок.
 Мы предлагаем лекарственные фитопрепараты к производству
 и агротехнологии лекарственных и ароматических культур
 для выращивания в различных регионах России

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45
 Fax: 8(495)712-09-18
 e-mail: vilarnii.ru
 www.vilarnii.ru