

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»

на правах рукописи

Рудометов Андрей Павлович

**Конструирование искусственных иммуногенов против ВИЧ-1, несущих
эпитопы, узнаваемые широконейтрализующими антителами**

03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
Карпенко Л.И.

Кольцово – 2018

Оглавление

Список используемых сокращений	4
Введение	6
1. Обзор литературы.....	12
1.1 Вирус иммунодефицита человека, общие сведения.....	13
1.2 Широконейтрализующие антитела при ВИЧ-инфекции	15
1.3 Кандидатные вакцины против ВИЧ-1.....	18
1.4 Иммуногены на основе тримеров поверхностных белков ВИЧ-1	23
1.5 Искусственные иммуногены.....	26
1.6 Заключение	30
2. Материалы и методы.....	31
2.1 Основные компоненты для приготовления питательных сред, реактивы, реагенты и прочие материалы	31
2.2 Методы	35
2.2.1 Конструирование генов рекомбинантных белков TBI_tag и nTBI.....	35
2.2.2 Нарботка и очистка рекомбинантных белков nTBI и TBI_tag	36
2.2.3 Вестерн-блот-анализ белков nTBI и TBI_tag	36
2.2.4 Иммунизация животных белками nTBI и TBI_tag	37
2.2.5 Очистка фракций суммарных IgG кроликов, иммунизированных белками nTBI и TBI_tag.....	38
2.2.6 Иммуноферментный анализ сывороток крови кроликов, иммунизированных белками nTBI и TBI_tag	38
2.2.7 New Lav Blot 1-анализ сывороток крови кроликов, иммунизированных белками nTBI и TBI_tag	39
2.2.8 Получение Env-псевдовирусов.....	39
2.2.9 Нейтрализующий анализ.....	40
2.2.10 Конкурентный анализ.....	41
2.2.11 Статистический анализ.....	41
2.2.12 Конструирование иммуногена HBcAg-mimicVRC01	42
2.2.13 Нарботка и очистка белков HBcAg и HBcAg-mimicVRC01	42
2.2.14 Вестерн-блот-анализ белков HBcAg и HBcAg-mimicVRC01	42

2.2.15 Дот-блот-анализ белков HBcAg и HBcAg-mimicVRC01	43
2.2.16 Электронная микроскопия частиц HBcAg	43
2.2.17 Получение и анализ сывороток животных, иммунизированных белками HBcAg и HBcAg-mimicVRC01	43
2.2.18 Конструирование гена химерного белка YkuJ-MPER	44
2.2.19 Конструирование гена искусственного белка MPER-TBI.....	46
2.2.20 Построение моделей взаимодействия YkuJ-MPER с Fab-фрагментами антител 10E8, 2F5 и 4E10	45
2.2.21 Нарботка и очистка рекомбинантных белков YkuJ-MPER и MPER-TBI	46
2.2.22 Дот-блот-анализ белков YkuJ-MPER и MPER-TBI.....	46
2.2.23 Круговой дихроизм.....	46
2.2.24 Получение и анализ сывороток животных, иммунизированных белками YkuJ-MPER и MPER-TBI	47
3. Результаты и их обсуждение.....	48
3.1 Иммуноген nTBI.....	48
3.2 Иммуноген против ВИЧ-1 на основе белка HBcAg, экспонирующий линейный пептид-имитатор, узнаваемый bNAb VRC01.....	69
3.3 Иммуногены против ВИЧ-1, несущие участки MPER ВИЧ-1 в составе белков TBI и YkuJ.....	74
3.3.1 Белок MPER-TBI.....	75
3.3.2 Белок YkuJ-MPER.....	78
Заключение	92
Выводы	94
Благодарности.....	96
Список литературы	97
Приложение 1	119
Приложение 2	120
Приложение 3	125

Список используемых сокращений

а.о. – аминокислотный остаток

АРТ – антиретровирусная терапия

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия

ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека первого типа

ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

ИФА – иммуноферментный анализ

КД – круговой дихроизм

кДа – килодальтон

МКА – моноклональное антитело

ОП – оптическая плотность

ПААГ – полиакриламидный гель

СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ADCC – антителозависимая клеточная цитотоксичность

BCIP – 5-бром-4-хлор-3-индолил-фосфат

bNAbs – broadly neutralizing antibodies (антитела, нейтрализующие широкий спектр изолятов ВИЧ-1)

CD4 – трансмембранный гликопротеин, рецептор ВИЧ-1

CD4bs – участок связывания gp120 с CD4

Env – белок оболочки ВИЧ-1

gp – гликопротеин

HBsAg – коровый белок вируса гепатита В

IC₅₀ – концентрация антител, при которой происходит нейтрализация 50 % псевдовирусов

InfB – фрагмент белка-активатора транскрипции *E. coli*

MPER – membrane-proximal external region (мембрано-проксимальный внешний регион белка gp41)

NBT – нитротетразолиевый синий

NIH – National Institute of Health (национальный институт здоровья США)

PBS – phosphate-buffered solution (фосфатно-солевой буферный раствор)

RLU – относительные люминесцентные единицы

SDS – sodium dodecyl sulfate (додецил сульфат натрия)

SHIV – simian-human immunodeficiency virus (гибридный вирус иммунодефицита обезьян/человека)

TBI – T and B cell epitopes containing immunogen (Т и В-клеточный иммуноген)

TCID₅₀ – доза заражения 50 % культуры клеток

TMB – 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид

Введение

Актуальность проблемы, связанная с ВИЧ-1-инфекцией, обусловлена весомым социально-экономическим ущербом и эпидемической значимостью этого заболевания, повсеместным распространением, тяжелыми последствиями, активным вовлечением в эпидемический процесс лиц репродуктивного и трудоспособного возраста. Согласно данным ЮНЭЙДС (Объединенная программа Организации объединенных наций по ВИЧ/СПИД), широкое применение антиретровирусной терапии позволило снизить количество новых случаев заражения ВИЧ-инфекцией в ряде регионов мира (UNAIDS, 2018). Однако в Российской Федерации и странах Восточной Европы число людей, впервые обнаруживших у себя ВИЧ, по-прежнему продолжает расти. По данным Роспотребнадзора, число зарегистрированных ВИЧ-инфицированных в РФ к концу 2017 года составило 1 220 659 человек. Сибирский федеральный округ относится к одному из самых пораженных эпидемией ВИЧ-инфекции регионов РФ (СПИД, 2018).

Несмотря на то, что высокоактивная антиретровирусная терапия (БААРТ) существенно продлевает жизнь ВИЧ-инфицированных, она не способна элиминировать вирус из организма ВИЧ-инфицированного (Lorenzo-Redondo и др., 2016; Eisinger и Fauci, 2018). Кроме того, среди наиболее важных проблем БААРТ можно назвать высокую стоимость антиретровирусных препаратов, наличие ряда побочных эффектов и формирование вирусов с множественной лекарственной устойчивостью.

Наиболее очевидным решением проблемы распространения ВИЧ-инфекции является применение эффективной профилактической вакцины (Eisinger и Fauci, 2018). К сожалению, по причине высокой генетической и, как следствие, антигенной вариабельности ВИЧ-1 до сих пор не удалось создать иммуноген, способный индуцировать формирование достаточного уровня протективного противовирусного иммунного ответа.

Решению проблемы могло бы помочь создание иммуногена, способного индуцировать антитела, обладающие вируснейтрализующей активностью против

широкого спектра генетических вариантов ВИЧ-1 (bNAbs, broadly neutralizing antibodies). В отличие от обычных антител bNAbs реагируют с консервативными эпитопами, обеспечивая защитный иммунитет против подавляющего большинства штаммов ВИЧ.

Одним из подходов к созданию таких иммуногенов является разработка нативных тримеров поверхностных гликопротеинов ВИЧ-1 (Briney и др., 2016; Haynes и Burton, 2017). Несмотря на прогресс в этом направлении, имеются определенные проблемы данной технологии. Одной из таких проблем является то, что тримеры экспонируют нежелательные иммунодоминантные поверхности, которые могут отвлекать адаптивный иммунный ответ от распознавания более иммунорецессивных, протективных эпитопов (Medina-Ramirez и др., 2017; Sahay и др., 2017).

Альтернативным подходом является конструирование полностью искусственных полиэпитопных анти-ВИЧ-иммуногенов, включающих набор защитных эпитопов, собранных в одну конструкцию (McMichael и Haynes, 2012; Hanke, 2014; Karpenko и др., 2014; Korber и др., 2017; Sahay и др., 2017). Это может позволить сфокусировать иммунный ответ только на протективных детерминантах, исключив из состава вакцины нежелательные эпитопы, которые способны индуцировать аутореактивные антитела или антитела, усиливающие инфекционность вируса. Перспективным направлением создания искусственных полиэпитопных В-клеточных иммуногенов является использование белков-носителей (скаффолдов), позволяющих наиболее эффективно представлять протективные эпитопы иммунной системе (Correia и др., 2010; Ofek и др., 2010; Habte и др., 2015; Banerjee и др., 2016).

В данной работе представлены результаты исследований, направленных на конструирование и изучение свойств искусственных ВИЧ-иммуногенов, содержащих эпитопы, узнаваемые bNAbs. Были выбраны два наиболее важных и хорошо охарактеризованных региона ВИЧ-1: регион gp41 мембранно-проксимальной наружной области (MPER, membrane-proximal external region), которая играет важную роль в процессе слияния вируса с клеткой-мишенью и

содержит линейные эпитопы широконейтрализующих антител, таких как 2F5, 4E10 и 10E8; и сайт связывания вируса с клеточным рецептором CD4 гликопротеина gp120 ВИЧ-1 (CD4bs), несущий конформационный эпитоп, узнаваемый bNAbs VRC01. В качестве белков-носителей эпитопов, узнаваемых широконейтрализующими ВИЧ-1 антителами, были использованы три молекулы: искусственный полиэпитопный белок TBI, коровый белок вируса гепатита В (HBsAg) и белок YkuJ *Bacillus subtilis*.

Цель и задачи исследования

Цель работы: конструирование и изучение ВИЧ-1 иммуногенов, несущих эпитопы, узнаваемые широконейтрализующими антителами, с использованием в качестве носителей полиэпитопного белка TBI, HBsAg и белка YkuJ.

Задачи исследования:

1. Спроектировать на основе TBI, HBsAg и YkuJ рекомбинантные белки, экспонирующие эпитопы bNAbs 10E8, 4E10, 2F5 и VRC01.
2. Получить генетические конструкции для создания бактериальных продуцентов спроектированных белков.
3. Провести очистку рекомбинантных иммуногенов и исследовать их физико-химические и антигенные свойства.
4. Исследовать иммуногенность рекомбинантных белков, включая их способность индуцировать нейтрализующие ВИЧ-1 антитела у лабораторных животных.

Научная новизна и практическая ценность работы

В ходе исследования были спроектированы и получены иммуногены pTBI, TBI-MPER, HBsAg-mimicVRC01 и YkuJ-MPER, включающие в свой состав эпитопы ВИЧ-1, узнаваемые широконейтрализующими антителами 10E8, 4E10, 2F5 и имитатор конформационного эпитопа, узнаваемый антителом VRC01.

Впервые показано, что имитатор конформационного эпитопа VRC01 в составе белка скаффолда (HBsAg) сохраняет свои иммуногенные свойства.

Впервые в качестве белка носителя был предложен и использован для презентации MPER региона ВИЧ-1 глобулярный белок *B. subtilis* YkuJ.

Показано, что включение эпитопа широконейтрализующего антитела 10E8 в состав белка TBI повышает вируснейтрализующую активность IgG у животных, иммунизированных модифицированным белком nTBI в сравнении с исходным белком.

Результаты работы, в частности иммуноген nTBI, защищены патентом РФ (приложение 1) и предполагаются к использованию в качестве В-клеточной компоненты модифицированной вакцины «КомбиВИЧвак».

Кроме того, полученные в работе рекомбинантные плазмиды могут быть использованы при разработке искусственных полиэпитопных иммуногенов для индукции ВИЧ-специфического В-клеточного ответа, а рекомбинантные белки-иммуногены – в качестве компонентов прайм-бустерных стратегий, направленных на индукцию bNAbs. Также представленные в процессе выполнения диссертационной работы результаты могут быть использованы специалистами в области конструирования искусственных белков – иммуногенов против ряда других вирусных инфекций человека и животных.

Бактериальные штаммы-продуценты рекомбинантных белков nTBI, TBI_tag и YkuJ-MPER были депонированы в «Коллекции микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, под номерами 1338, 1339 и 1340 соответственно.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Сконструированный иммуноген nTBI, содержащий нативные эпитопы bNAbs 10E8, 4E10, 2F5 и линейный миметик эпитопа bNAbs VRC01, при иммунизации кроликов способен индуцировать образование антител, нейтрализующих ряд псевдотипированных штаммов ВИЧ-1.

2. Химерный белок HBcAg-mimicVRC01, экспонирующий линейный пептид-имитатор, узнаваемый bNAbs VRC01, образует частицы, подобные нативному коровому белку вируса гепатита В. Сыворотки крови животных, иммунизированных HBcAg-mimicVRC01, обладают вируснейтрализующей активностью в отношении молекулярного клона ВИЧ-1 92BR025.

3. В составе искусственного белка MPER-TBI последовательность MPER сохраняет α -спиральную структуру, присущую ей в составе вириона ВИЧ-1.

4. Белки МРЕР-ТВИ и YkuJ-MPER индуцируют в организме лабораторных животных выработку специфичных антител к МРЕР региону ВИЧ-1.

Апробация работы и публикации

Представленные в диссертации результаты были доложены на конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (Кольцово, Россия, 2015); научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе» (Новосибирск, Россия, 2016); конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio», (Кольцово, Россия, 2016); научном форуме «Биомедицина-2016» (Новосибирск, Россия, 2016); международном научном форуме студентов и молодых ученых «Науки о жизни – от исследований к практике» (Барнаул, Россия, 2017); конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio», (Кольцово, Россия, 2017), по итогам которых опубликовано 20 тезисов.

По материалам диссертации опубликовано пять статей, из них две статьи в журналах из списка ВАК, рекомендованных для защиты диссертаций, 1 патент.

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя заключался в планировании экспериментов, разработке стратегии исследования. Все основные эксперименты, включая конструирование рекомбинантных плазмид, кодирующих полиэпитопные иммуногены, наработку препаративного количества рекомбинантных белков, их очистку и дальнейшее изучение, а также иммунизацию лабораторных животных, выполнены автором лично. Иммунохимический анализ сывороток животных выполнен совместно с сотрудниками отдела биоинженерии О. Н. Каплиной и Н. Б. Андреевой. Дизайн аминокислотной последовательности иммуногенов выполнен совместно с А. Н. Чикаевым и Д. Н. Щербаковым. Компьютерное моделирование пространственных структур белков проведено А.Ю. Бакулиной. Определение вторичной структуры белков выполнено методом кругового дихроизма в ИХБФМ СО РАН, к.ф.-м.н. А. А. Ломзовым. Анализ образцов с помощью электронной микроскопии выполнен Б. Н. Зайцевым. Статистический

анализ выполнен совместно с сотрудником теоретического отдела Д. В. Антонцом.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 129 страницах, включает 34 рисунка, 3 таблицы, 3 приложения. Список литературы включает 167 источников.

1. Обзор литературы

В 1981 году в ряде крупных городов США была зарегистрирована вспышка инфекционного заболевания, вызываемого *Pneumocystis carinii* – грибом, который при нормальном состоянии иммунитета не вызывает инфекции. Эпидемиологический анализ показал, что заболевание распространяется среди лиц, имеющих интимные контакты с инфицированным индивидуумом. В ходе исследований было обнаружено, что иммунная система у данных пациентов была серьезно нарушена вследствие очень низкого количества Т-лимфоцитов (Gottlieb и др., 1981). Впоследствии данное явление было названо синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД) (Marx, 1982).

В 1983 году был открыт агент, вызывающий заболевание иммунной системы – вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). Инфекционная природа ВИЧ была доказана независимо двумя группами ученых. Группе французских вирусологов во главе с Люком Монтанье удалось выделить до того времени неизвестный ретровирус из лимфоидных ганглий (Barré-Sinoussi и др., 1983). Для выявленного агента авторами было предложено название LAV (lymphadenopathy-associated virus). Спустя несколько месяцев группой под руководством Роберта Галло были опубликованы результаты исследований, согласно которым причиной СПИД мог стать выделенный ими ретровирус, названный HTLV III (Human T Lymphotropic Virus type III) (Popovic и др., 1984). В 1986 году был идентифицирован гораздо менее вирулентный и менее инфекционный агент, вызывающий СПИД, который был назван LAV II (Clavel и др., 1986). Когда было подтверждено, что LAV и HTLV III были идентичны, вирус был переименован в вирус иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1), а LAV II был переименован в ВИЧ-2.

В 2008 году Франсуазе Барре-Синусси и Люку Монтанье была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине за открытие вируса иммунодефицита человека.

1.1 Вирус иммунодефицита человека, общие сведения

Генетический материал вируса иммунодефицита состоит из двух копий молекул РНК. Геном включает в себя 9 генов, которые кодируют 15 белков (Freed, 2015). Обе копии РНК с обеих сторон фланкированы последовательностями нуклеотидов, называемыми длинными концевыми повторами (LTR, long terminal repeats), размер которых равняется 600–700 парам нуклеотидов каждый. Эти повторы отвечают за продукцию вируса и активируются как белками вируса, так и белками клетки хозяина.

С генов *gag* и *pol* транскрибируется единая молекула информационной РНК, с которой транслируются белки Pol и Gag. Ген *pol* кодирует три фермента: обратную транскриптазу, интегразу и протеазу. При этом все эти ферменты образуются из одного белка предшественника Pol путем его расщепления с помощью собственной протеазы вируса. Полипротеин Gag p55, кодируемый геном *gag*, также расщепляется на несколько структурных белков вируса p6, p7, p17, p24. Белок gp160, кодируемый геном *env*, расщепляется клеточной эндопротеазой на структурные белки gp41 и gp120 (Levy, 2007). Оставшиеся шесть генов *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpr* кодируют белки, ответственные за производство новых вирусных частиц и за инфицирование клеток. Считается, что продукты генов *nef*, *vif*, *vpr*, *vpr* не влияют на репликацию вируса *in vitro*, тем не менее, они необходимы для полноценной инфекции клеток мишеней *in vivo* (Malim и Emerman, 2008; Nomaguchi и др., 2008; Guatelli, 2009).

Вирус иммунодефицита человека отличается поразительной генетической изменчивостью, в результате чего он может изменять антигенную структуру быстрее, чем иммунная система переключается на новые антигенные варианты. Частота возникновения мутаций у ВИЧ достигает 10^{-4} на цикл репликации, что существенно превышает изменчивость таких высоковариабельных объектов, как вирус гриппа или вирус гепатита С. Исходя из размера генома ВИЧ-1 примерно 10 000 нуклеотидов, получается, что каждый дочерний геном хотя бы на один нуклеотид отличается от своего предшественника.

Вирион ВИЧ-1 представляет собой сферическую частицу диаметром 100 нанометров (McGovern и др., 2002). Капсид вириона образован молекулами белка р24. Внутри капсида находятся две нити вирусной РНК, прочно связанные с белком р7, а также обратная транскриптаза, протеаза и интеграз. Капсид окружен оболочкой, образованной матриксным белком р17. Сама оболочка в свою очередь окружена двуслойной липидной мембраной, являющейся наружной оболочкой вируса, которая состоит из фосфолипидов, захваченных вирусом во время его отпочковывания от клетки (Pudney и Song, 1994). В липидную мембрану встроены гликопротеиновые комплексы Env, каждый из которых образован тремя молекулами трансмембранного гликопротеина gp41, служащего «якорем» комплекса, и тремя молекулами поверхностного гликопротеина gp120 (Turner и Summers, 1999). Проникновение ВИЧ в клетку-мишень и слияние «клетка – клетка» происходят через эти тримерные комплексы.

Субъединица gp120 содержит сайт связывания с рецептором CD4 и ко-рецепторами CCR5 или CXCR4 клетки-мишени. Субъединица gp41 опосредует слияние вируса и мембраны клетки. Связывание с рецептором CD4 индуцирует начало каскада конформационных изменений в белках gp120 и gp41, необходимых для слияния вируса с клеткой. Ключевым фрагментом gp41, отвечающим за этот процесс, является небольшой N-концевой гидрофобный пептид слияния, богатый глицином (Eckert и Kim, 2001; Sanders и Moore, 2014; Harrison, 2015).

Следует отметить, что на вирусной частице только часть субъединиц gp120-gp41 образуют функциональный тример (Eckert и Kim, 2001; Sanders и Moore, 2014; Harrison, 2015). В среднем на вирионе присутствует около 14 функциональных тримеров Env (Zhu и др., 2006). Предполагается, что наряду с функциональными тримерами белка Env, на оболочке вируса присутствуют другие типы тримеров. К таким тримерам можно отнести нефункциональную конформацию Env, нерасщепленные белки-предшественники gp160, фрагменты gp41, не имеющие своего партнера gp120 (рисунки 1) (Parren и др., 1997; Poignard и др., 2003; Moore и др., 2006; Agrawal и др., 2011; Crooks и др., 2011). Кроме того,

мономерные gp120-субъединицы в случае диссоциации начинают циркулировать в виде растворимых белков, а на вирусных частицах экспонированы только gp41 (Parren и др., 1997; Moore и др., 2006).

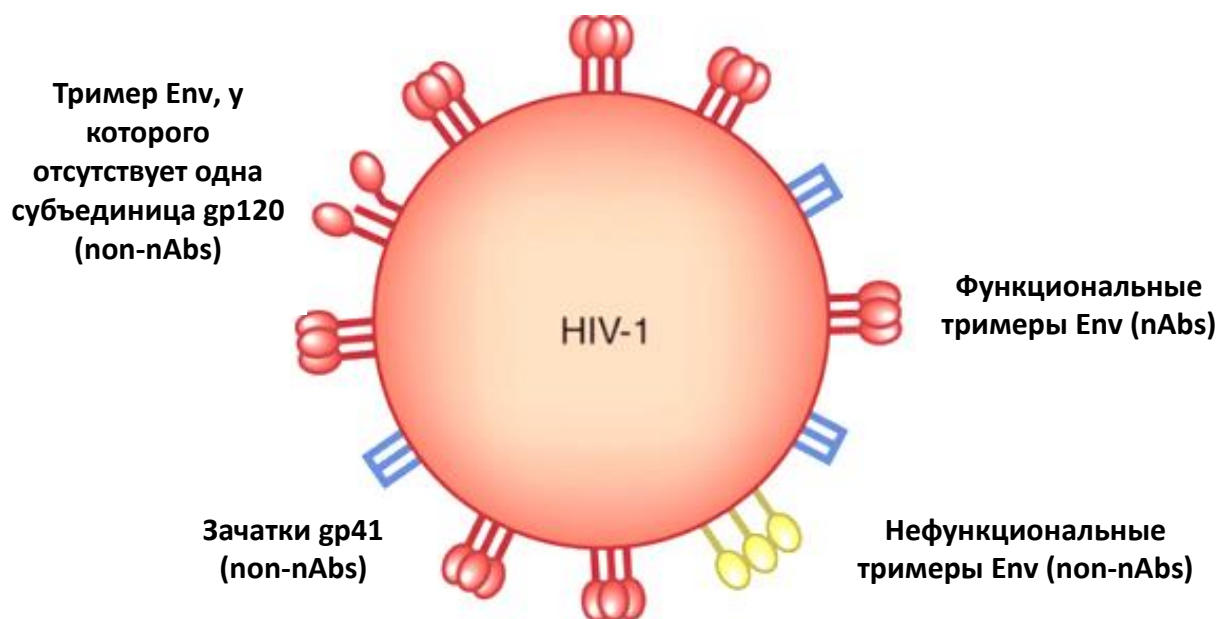


Рисунок 1. Схематическое изображение некоторых форм тримеров поверхностных гликопротеинов, которые могут присутствовать на частице ВИЧ-1 (Burton и Mascola, 2015)

Еще одна особенность ВИЧ заключается в том, что в организме нарабатывается большое количество дефектных вирусных частиц, которые не способны заразить клетку-мишень (McMichael и Hanke, 2003; Wei и др., 2003). Дефектные частицы, экспонирующие нефункциональные тримеры или свободный gp120, отвлекают ресурсы иммунной системы хозяина, вследствие чего образуется большое количество не-нейтрализующих антител.

1.2 Широконейтрализующие антитела при ВИЧ-инфекции

Долгое время было широко распространено мнение о том, что большая изменчивость вирусных гликопротеинов будет абсолютным препятствием на пути развития терапии или профилактической вакцины на основе нейтрализующих антител против большого генетического разнообразия ВИЧ-1. Однако благодаря появлению новых подходов к высокоэффективному анализу В-клеток и

плазматических клеток памяти человека был идентифицирован целый ряд антител, способных нейтрализовать широкий спектр первичных изолятов ВИЧ-1 (bNAbs) (Burton и Mascola, 2015; Korber и др., 2017). Показано, что bNAbs с широтой нейтрализации более 50 % развиваются у 20–50 % хронически ВИЧ-инфицированных (Gray и др., 2011; Hraber и др., 2014; Korber и др., 2017).

Ряд bNAbs способны нейтрализовать более 90 % первичных изолятов ВИЧ-1. bNAbs отличаются от обычных антител рядом особенностей, а именно высоким уровнем соматических мутаций и необычно протяженными вариабельными петлями, что обеспечивает им возможность связываться с консервативными, но малодоступными районами Env ВИЧ-1 (Shcherbakov и др., 2015; Haynes и Burton, 2017).

Существование bNAbs свидетельствует о наличии высококонсервативных эпитопов на тримерах ВИЧ-1 и способности иммунной системы вырабатывать такие антитела (Johnston и Fauci, 2011; Mouquet и Nussenzweig, 2013; Nabel, 2013). За последнее десятилетие был достигнут значительный прогресс как в выделении различных bNAbs у ВИЧ-инфицированных людей, так и в определении уязвимых и относительно консервативных сайтов на оболочке ВИЧ-1 (Env), с которыми взаимодействовали выделенные антитела (Burton и др., 2012; Kwong и Mascola, 2012; Mascola и Haynes, 2013; Burton и Mascola, 2015).

На данный момент установлено несколько областей «уязвимости» Env ВИЧ-1, на которые нацелены bNAbs (Wu и Kong, 2016; Korber и др., 2017; McCoy и Burton, 2017). К данным участкам относятся: участок прикрепления gp120 к рецептору CD4 (CDbs); V1/V2-петля, на которой обнаружены эпитопы, содержащие N-связанные гликаны в позиции Asn160; V3-петля, на которой находятся эпитопы, включающие N-связанные гликаны в позиции Asn332; область взаимодействия gp120 и gp41; участок на gp41, примыкающий к цитоплазматической мембране (MPER, мембрано-проксимальная наружная область); и пептид слияния, обеспечивающий слияние вируса с клеткой (рисунок 2) (Kwong и др., 2013; Xu и др., 2018). Все эти регионы уязвимости

являются консервативными эпитопами белков ВИЧ-1 и могут использоваться для конструирования вакцин, способных индуцировать bNAbs.

Информацию о характеристиках эпитопов, узнаваемых bNAbs, можно рассматривать как первый шаг к разработке иммуногенов для вакцины против ВИЧ-1. Задача исследователей заключается в использовании знаний о структуре эпитопов и их окружения для конструирования иммуногенов на их основе. Нужно понять, как использовать эпитоп данного bNAb в конкретном антигенном контексте, чтобы выявить специфичность определенного антитела после иммунизации (Wu и Kong, 2016; Korber и др., 2017; McCoy и Burton, 2017).

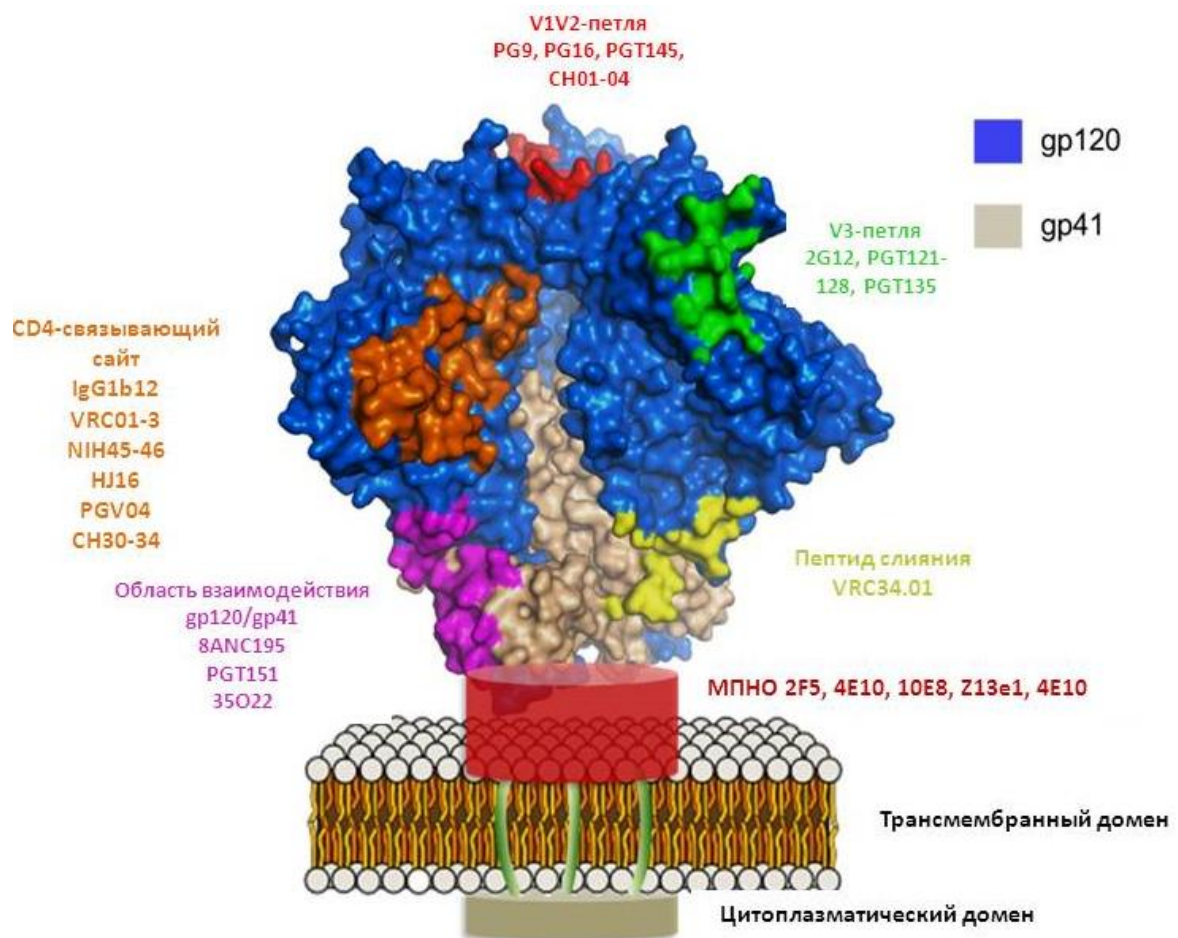


Рисунок 2. Сайты связывания широконейтрализующих антител на модели Env-тримера (модель была построена по данным (Pancera и др., 2014)). V1/V2-петля обозначена красным, V3-петля – зеленым, CD4-связывающий сайт – оранжевым, область взаимодействия gp120 и gp41 – сиреневым, пептид слияния – желтым, мембрано-проксимальная наружная область – коричневым. Трансмембранный и цитоплазматический домены имеют лишь ограниченную структурную информацию и выделены для справки (Bonsignori и др., 2017)

Ряд препаратов широконейтрализующих антител проходит доклинические исследования или уже находятся в I фазе клинических испытаний, которые получили название Antibody Mediated Prevention study (исследование защиты, опосредованной антителами). Первым было исследовано моноклональное антитело VRC01. При введении обезьянам это антитело обеспечивало защиту животных от инфицирования гибридного вируса SHIV. В ходе клинических испытаний пассивное введение VRC01 обеспечивало снижение вирусной нагрузки у ВИЧ-инфицированных добровольцев (Stephenson и др., 2016).

В настоящее время готовятся к клиническим испытаниям моноклональные антитела VRC07-523LS, 10E8VLS, N6LS, 3BNC117, PGT121 (IAVI Report, 2018).

Все эти данные, с одной стороны, раскрывают большой потенциал, которым обладает иммунная система для противодействия ВИЧ-1, а с другой – позволяют утверждать, что вакцина, способная вызвать выработку широконейтрализующих антител, сможет защитить от этой инфекции.

1.3 Кандидатные вакцины против ВИЧ-1

Для создания вакцин против ВИЧ-1 были использованы все известные подходы, включая использование инактивированных, аттенуированных форм вируса, субъединичных вакцин, состоящих из отдельных вирусных гликопротеинов, ДНК-вакцин, а также препаратов на основе рекомбинантных вирусных и бактериальных векторов (Sahay и др., 2017).

Кандидатные вакцины первого поколения (такие как AIDSVAX B/B и AIDSVAX B/E) были сконструированы с целью стимуляции гуморального иммунитета, то есть выработки антител, нейтрализующих вирус. Создание подобных вакцин основывалось на использовании полноразмерных белков оболочки ВИЧ либо их фрагментов (Billich, 2004). Вакцины второго поколения (например, Merck Ad5 gag/pol/nef субтипа B) были направлены на стимуляцию клеточного ответа и выработку цитотоксических лимфоцитов (CTL), способных эффективно распознавать и элиминировать ВИЧ-инфицированные клетки (O'Connell и др., 2012). Ряд кандидатных вакцин прошли клинические испытания, однако их эффективность не была продемонстрирована (Haynes, 2015).

Первые обнадеживающие и статистически значимые результаты были получены в клинических испытаниях RV144 в Таиланде с использованием прайм-бустерной системы, включающей две ранее созданные вакцины ALVAC-HIV (Sanofi Pasteur) и AIDSVAX B/E gp120 (VAXGEN) (Rerks-Ngarm и др., 2009). Испытание RV144 показало эффективность защиты 31,2 % в объединенной группе добровольцев с низким / средним / высоким уровнем риска (Rerks-Ngarm и др., 2009). Была установлена корреляция защиты от активной инфекции с наличием Env-специфических pNABs, связанных с антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) и Env-специфическими CD4⁺ Т-клетками (Haynes и др., 2012).

Клинические испытания RV144 позволили сделать несколько важных выводов: 1) вакцина против ВИЧ-1 – это не миф, а реальность; 2) эффективная вакцина должна индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ против ВИЧ-1; 3) для повышения эффективности вакцины необходимы новые подходы к их созданию (McMichael и Haynes, 2012; Hsu и O'Connell, 2017; Eisinger и Fauci, 2018).

В настоящее время на стадии клинических испытаний находятся новые поколения кандидатных вакцин, сконструированные с учетом новых знаний о структуре ВИЧ-1 и идентификации вирусных эпитопов, узнаваемых широконейтрализующими антителами.

После успехов клинических испытаний RV144 в Таиланде, в 2016 году в Южной Африке начались испытания под названием HVTN 702, с участием 5400 добровольцев. Известно, что ежедневно в этом регионе более 1000 человек заражаются ВИЧ, а в 2014 году вирусом были инфицированы около 2,4 миллионов людей. В такой ситуации вакцина, обладающая даже умеренной эффективностью, поможет существенно снизить заболеваемость ВИЧ-инфекцией. В ходе испытаний HVTN 702 исследователи оценивают обновленную версию схемы вакцинации (которую уже тестировали в рамках испытания RV144) и модифицированный иммуноген, основанный на ВИЧ-1 субтипа С, который

является доминирующим в Южной Африке. Результаты испытаний HVTN 702 планируется опубликовать к 2020 году (Dumiak, 2018).

Второе крупное исследование в Южной Африке под названием HVTN 705/HPX2008 началось в ноябре 2017 года. Оно предусматривает оценку эффективности и безопасности «мозаичной» профилактической схемы вакцинации от ВИЧ. В основе этой схемы – праймирование четырехвалентным коктейлем из мозаичных антигенов Env / Gag / Pol, и бустирование растворимым белком gp140 субтипа C (ClinicalTrials.gov, 2018).

В 2018 году объявлен набор добровольцев для участия в испытаниях HVTN 115, проводимого Центром по разработке иммуногенов и Иммунологии ВИЧ/СПИД вакцин (CHAVI-ID, США). В ходе данного испытания будет исследована возможность индуцировать процесс созревания bNAbs путем последовательной иммунизации добровольцев четырьмя HIV gp120 Env вместе с липидным адъювантом GLA-SE. Эти иммуногены соответствуют белкам оболочки вируса, выделенного у ВИЧ-инфицированного индивидуума, у которого в ходе инфекции появились bNAbs. Первая часть исследования предназначена для определения оптимальной дозы белка Env. Во второй части – будет проводиться последовательная иммунизация набором белков Env, и бустирование кандидатной ДНК-вакциной (DNA Mosaic-Tre Env) для усиления иммунного ответа (ClinicalTrials.gov, 2018).

В качестве примера эффективного использования иммуногенов, основанных на эпитопах ВИЧ-1, можно привести работу, опубликованную в журнале Nature Medicine 2018 (Xu и др., 2018). В качестве иммуногена авторы использовали пептид слияния ВИЧ-1 (FP), являющийся эпитопом, узнаваемым bNAbs N123-VRC34.01. В качестве белка-носителя – гемоцианин улитки. Последовательная иммунизация конъюгатом гемоцианина с пептидом FP, а затем ENV-тримером, приводила к формированию нейтрализующих антител у мышей, морских свинок и у нечеловеческих приматов. Эта работа показывает

возможность реализации подхода разработки вакцин на основе эпитопов ВИЧ-1 (Хи и др., 2018).

В России также проводятся работы по разработке вакцины против ВИЧ-1. ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России совместно с НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН создали кандидатную вакцину «ВИЧРЕПОЛ» (Gudima и др., 2007; Korobova и др., 2007; Гудима и др., 2007; Korobova и др., 2008). В состав вакцины вошел рекомбинантный белок Rec(24-41), конъюгированный с синтетическим иммуномодулятором полиоксидонием. «ВИЧРЕПОЛ» была первая из российских вакцин, которая прошла I фазу клинических испытаний и получила разрешение на проведение II фазы.

В Санкт-Петербургском биомедицинском центре и ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА разработана вакцина «ДНК-4» на основе генов, кодирующих белки преобладающего в России ВИЧ-1 субтипа А (Мурашев и др., 2007). Вакцина направлена в большей степени на стимуляцию клеточного ответа, в ее состав входят четыре плазмидных ДНК, кодирующих белки Gag, RT, gp140 и Nef ВИЧ-1. Была продемонстрирована безвредность «ДНК-4» в ходе I фазы клинических испытаний на здоровых добровольцах. В данный момент проходит II фазу терапевтический вариант вакцины, предназначенный для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов.

Как показал анализ клинических испытаний RV144, успешная вакцина против ВИЧ-1 должна стимулировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет. При этом индукция гуморального ответа может потребоваться для предотвращения заражения ВИЧ, в то время как клеточный ответ может быть крайне необходимым для контроля вирусной репликации у ВИЧ-инфицированных, ранее вакцинированных против ВИЧ-1 (Esparza, 2012).

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» была разработана кандидатная вакцина «КомбиВИЧвак» на основе двух полиэпитопных иммуногенов для индукции В- и Т-клеточного иммунного ответа (Бажан и др., 2004; Karpenko и др., 2007; Карпенко и др., 2016).

«КомбиВИЧвак» создана в виде мицеллоподобных наночастиц на основе оригинальной технологии, суть которой – объединение в рамках одной конструкции двух разных иммуногенов: полиэпитепного белка TBI, и ДНК-вакцины pcDNA-TCI, кодирующей полиэпитепный белок TCI (Karpenko и др., 2004; Karpenko и др., 2007). Оболочка состоит из конъюгата (декстран-спермидин-TBI). Входящий в состав вакцины спермидин обеспечивает конъюгату положительный заряд и, связываясь с ДНК-вакциной, обеспечивает самосборку наночастиц, размер которых (40–100 нм) близок к размерам вириона ВИЧ-1 (Karpenko и др., 2017).

Преимущество данной технологии состоит в доставке в рамках в одной частицы одновременно двух вакцинных компонентов, одним из которых является белок, а другим – ДНК, так же, как и в случае вакцин на основе аттенуированных вирусных векторов. При этом белок TBI представлен во множестве копий на поверхности частицы, что позволяет значительно повысить его иммуногенность. Кроме того, оболочка из полимера глюкозы защищает ДНК-вакцину pcDNA-TCI от действия нуклеаз, что также способствует увеличению иммуногенности вакцины за счет повышения ее стабильности.

Было показано, что «КомбиВИЧвак» индуцирует ВИЧ-специфические ответы как В-, так и Т-лимфоцитов, причем при объединении в одной вакцине двух иммуногенов, TBI и TCI, наблюдается синергический эффект в отношении индукции В-клеточного ответа по сравнению с конструкциями, содержащими только один иммуноген (либо белок TBI, либо плазмиду pcDNA-TCI) (Bazhan и др., 2008).

В ходе доклинических испытаний, проведенных на нескольких видах животных, была продемонстрирована иммуногенность и безопасность «КомбиВИЧвак». В настоящее время успешно завершена I фаза и получено разрешение на проведение II фазы клинических испытаний вакцины. Результаты испытаний подтверждают, что кандидатная вакцина «КомбиВИЧвак» является безопасной, не вызывает побочных эффектов и индуцирует ВИЧ-специфический.

1.4 Иммуногены на основе тримеров поверхностных белков ВИЧ-1

В настоящее время, одним из активно развивающихся направлений по дизайну иммуногенов направленных на индукцию bNAbs связано с разработкой нативных поверхностных тримеров ВИЧ-1 (Briney и др., 2016; Haynes и Burton, 2017; Medina-Ramírez и др., 2017; Dey и др., 2018). В данной главе будет рассмотрена эволюция исследований в данном направлении.

В первых работах, посвященных получению иммуногена, направленного на индукцию bNAbs, были использованы мономеры белка gp120 ВИЧ-1, на котором представлены области V3 и CD4bs, отвечающие за связывание с нейтрализующими антителами (Moore, 1995; VanCott и др., 1995). Оказалось, что мономеры белка Env (gp120) были неспособны индуцировать NAbs, которые были бы активны против устойчивых (Tier-2) вирусов, и они не смогли обеспечить защиту при тестировании в клинических испытаниях III фазы (Flynn и др., 2005; Pitisuttithum и др., 2006; Gilbert и Walker, 2010). Поэтому, в настоящее время одним из активно развивающихся направлений по дизайну иммуногенов, направленных на индукцию bNAbs, является разработка иммуногенов на основе тримерных комплексов белка Env ВИЧ-1 (Briney и др., 2016; Haynes и Burton, 2017; Medina-Ramírez и др., 2017; Dey и др., 2018). Работа над получением тримеров, которые бы удовлетворяли двум основным требованиям – сохранению целостности и стимулированию выработки нейтрализующих антител против широкого спектра ВИЧ-1, состояла из ряда этапов.

Несколько исследовательских групп попытались сделать тримерные имитаторы шипа Env, то есть конструкции, которые содержали обе субъединицы gp120 и gp41 и были способны принимать тримерные конфигурации (Earl и др., 1991; Binley и др., 2000). Поскольку, как правило, белки, связанные с мембраной, сложнее синтезировать и очищать, чем растворимые, исследователями было принято решение укоротить субъединицу gp41 путем добавления стоп-кодона перед трансмембранным доменом. В результате были получены растворимые gp140, содержащие субъединицы gp120 и эктодомен gp41 (gp41ECTO), и не содержащие трансмембранные и цитоплазматические области (Earl и др., 1991).

Однако оказалось, что устранение «нежелательных» областей gp41 отрицательно влияет на стабильность уже метастабильного тримера: растворимые gp140s быстро диссоциировали в составляющие их субъединицы: мономеры gp120 и тримеризованную форму gp41ECTO (Earl и др., 1991; Binley и др., 2000).

Для того чтобы предотвратить диссоциацию gp120, было принято решение инактивировать сайт расщепления REKR между gp120 и gp41ECTO с помощью модификации в последовательность, которая не была бы субстратом для фуриновой протеазы (Earl и др., 1991; Yang и др., 2000). В результате компоненты gp120 и gp41ECTO оставались ковалентно связанными, что позволяло очищать белок gp140 нужного размера (то есть желаемое количество каждой субъединицы – три). Однако выход этих тримеров был довольно низким, поскольку секретируемые белки Env были сильно гетерогенными (Earl и др., 1994; VanCott и др., 1995; Jeffs и др., 2004). Наряду с фракцией тримера в препаратах в значительных количествах присутствовали мономеры, димеры и высокомолекулярные агрегаты gp140; последние, как известно, возникают в том числе из-за несоответствующего образования межмолекулярных дисульфидных связей (Go и др., 2015; Ringe и др., 2015; Wiczorek и др., 2015).

Альтернативой устранению сайта расщепления между gp120 и gp41ECTO при создании растворимых тримеров было сохранение сайта, а затем устранение последствий нестабильности.

Наиболее очевидным проявлением нестабильности расщепленных белков gp140 была немедленная диссоциация gp120 из gp41ECTO (Binley и др., 2000). Чтобы преодолеть эту проблему, было осуществлено введение соответственно расположенных цистеиновых остатков (501C-605C, названных SOS), что привело к формированию дисульфидной связи между двумя субъединицами (Binley и др., 2000). Полученные в результате SOS gp140 были все еще очень неустойчивыми, диссоциируя в gp120-gp41ECTO мономеры из-за склонности компонентов gp41 к конформационным переходам к конфигурации пост-слияния (Sanders и др., 2002; Schulke и др., 2002). Для стабилизации структуры была введена мутация в точку разрыва спирали (I559P) (Sanders и др., 2002). Полученная конструкция, затем

обозначенная как SOSIP gp140, позволила эффективно получать тримеры, судя по имеющимся на тот момент аналитическим методам их анализа (Sanders и др., 2002).

Оказалось, что гидрофобный MPER на С-конце gp41ECTO имел тенденцию приводить к агрегации тримеров, а также захватывал липиды из культуральной среды и (или) клетки-продуцента. Возникшие проблемы были преодолены путем делеции фрагмента MPER. Новый вариант был назван SOSIP.664, так как С-терминальный остаток теперь находился в позиции 664 вместо прежнего местоположения, позиции 681 (Khayat и др., 2013; Klasse и др., 2013). Таким образом, была получена более стабильная конструкция, однако в результате часть важных эпитопов из MPER-региона (содержащего эпитопы, узнаваемые bNAbs), была удалена.

Новый этап в совершенствовании методов получения стабильных тримеров начался после рентгеноструктурного анализа комплексов ряда bNAbs с тримерами. Это позволило понять, каким образом их можно стабилизировать.

В 2013 году Мур и Сандерс с соавторами опубликовали работу, в которой были представлены результаты по успешной стабилизации белка Env ВИЧ в соответствующей нативной форме (Sanders и др., 2013). Предварительно они провели скрининг множества вирусных изолятов на предмет поиска Env, наиболее подходящего по структуре. В результате они остановились на вирусе субтипа А (штамм BG505), выделенном от ВИЧ-инфицированного 6-ти месячного младенца из Кении, у которого в последствии были зарегистрированы bNAbs к ВИЧ-1 (Wu и др., 2006; Goo и др., 2014). В результате была получена конструкция BG505 SOSIP.664, которая на данный момент считается одним из наиболее удачных вариантов тримеров. В доклинических испытаниях на кроликах и обезьянах было показано, что BG505 SOSIP.664 способны индуцировать вируснейтрализующие антитела tier 1 и tier 2 уровней устойчивости. В настоящее время идут клинические испытания этой конструкции (AIVI report.org).

Однако, несмотря на значительный прогресс в разработке нативных тримеров, остаются проблемы, которые еще не решены. В частности, хотя

тримеры относительно стабильны в растворе, они могут приобретать неоптимальные конформации, которые неспособны индуцировать bNAbs. Кроме того, тримеры экспонируют нежелательные иммунодоминантные поверхности, которые могут отвлекать адаптивный иммунный ответ от распознавания целевых эпитопов на тримере (Medina-Ramirez и др., 2017; Sahay и др., 2017).

1.5 Искусственные иммуногены

Одним из подходов, позволяющим преодолеть проблемы, характерные для тримеров, является создание полностью искусственных ВИЧ-иммуногенов, включающих набор защитных В- и Т-клеточных эпитопов из основных вирусных антигенов, собранных в одну полиэпитопную конструкцию и способных индуцировать образование нейтрализующих антител, в том числе антител широкого спектра действия и ответы цитотоксических (CD8⁺ CTL) и хелперных (CD4⁺ Th) Т-лимфоцитов (McMichael и Haynes, 2012; Hanke, 2014; Karpenko и др., 2014; Korber и др., 2017; Sahay и др., 2017). Это позволяет сфокусировать иммунный ответ только на протективных детерминантах, исключив из состава вакцины нежелательные эпитопы, которые способны индуцировать аутореактивные антитела или антитела, усиливающие инфекционность вируса.

Полиэпитопные Т-клеточные ВИЧ-иммуногены разрабатываются рядом исследователей (Fischer и др., 2007; Sandström и др., 2008; Bazhan и др., 2010; Karpenko и др., 2012; Borthwick и др., 2014; Hanke, 2014; Reguzova и др., 2015; Ondondo и др., 2016). Некоторые из них индуцировали CD8⁺ CTL ответы гораздо более эффективно, чем вакцины, содержащие только консенсусные антигенные последовательности ВИЧ дикого типа (McMichael и Haynes, 2012; Hanke, 2014; Ondondo и др., 2016). Ряд полиэпитопных Т-клеточных вакцин уже прошел I фазу клинических испытаний (Afolabi и др., 2013; Karpenko и др., 2016; Borthwick и др., 2017).

Создание искусственных В-клеточных ВИЧ-иммуногенов, в том числе с использованием эпитопов широконейтрализующих антител, является более сложной задачей, поскольку большинство из них узнают конформационные эпитопы и значительно реже – линейные эпитопы (Wu и Kong, 2016; Korber и др.,

2017; McCoy и Burton, 2017). Более того, конформационные В-клеточные эпитопы на ВИЧ часто формируются липидами и гликанами или их комбинациями (Wu и Kong, 2016; Cerutti и др., 2017; Korber и др., 2017; McCoy и Burton, 2017), что еще больше затрудняет дизайн иммуногенов, способных индуцировать желаемый В-клеточный ответ.

Одним из направлений создания искусственных полиэпитопных В-клеточных иммуногенов является использование белков-скаффолдов, экспонирующих эпитопы широконейтрализующих антител. Такие скаффолды могут экспонировать один или несколько эпитопов bNAbs, встроенных в их состав таким образом, чтобы обеспечить наилучшую презентацию желаемого эпитопа иммунной системе (Correia и др., 2010; Ofek и др., 2010; Habte и др., 2015; Banerjee и др., 2016). Так, скаффолды были способны индуцировать bNAbs 4E10 и 2F5-подобные антитела у лабораторных животных (Correia и др., 2010; Ofek и др., 2010). Опираясь на данные, опубликованные авторами (Correia и др., 2010; Ofek и др., 2010; Azoitei и др., 2011; Sun и др., 2016), можно предположить, что основным условием при создании успешного иммуногена должна быть полная или почти полная имитация пространственного расположения аминокислотной последовательности эпитопа, узнаваемого bNAbs, в комплексе с антителом. Точное воспроизведение конформации может позволить адресно «нацелить» иммунную систему на целевой эпитоп. Наиболее подходящими для этих целей являются эпитопы, входящие в состав белка gp41. Эти эпитопы, узнаваемые нейтрализующими антителами (2F5, 4E10, 10E8), являются линейными, поэтому именно их легче воспроизвести в необходимой конформации в составе искусственного иммуногена. Характерной особенностью данных антител является то, что они распознают липиды и часто обладают аутореактивностью. В то же время в экспериментах по исследованию аутоиммунитета обнаружено, что антитела этой же категории, например, 10E8 (нейтрализующие подавляющее большинство штаммов ВИЧ-1), не обладают аутореактивностью (Huang и др., 2012). По-видимому, существуют пути созревания В-клеток, которые могут избегать клональной делеции В-клеточных предшественников (механизм

толерантности), а значит, увеличивается вероятность получения таких антител с помощью вакцинации (Взоров и Урываев, 2017).

При использовании скаффолдов в качестве носителей эпитопов возникают определенные трудности, связанные с тем, что белок-носитель может содержать иммунодоминантные области, которые снижают иммунный ответ на встраиваемые (целевые) эпитопы (Burton, 2010). Поэтому во многих исследованиях при создании иммуногена против ВИЧ-1 большое внимание уделяется ослаблению иммуногенности нежелательных эпитопов (Schief и др., 2009; Sanders и др., 2013; Crooks и др., 2015; Leaman и др., 2015). То есть весьма важно уделять внимание выбору и конструированию самого скаффолда.

Следует также отметить интересную работу исследователей (Ху и др., 2018), которые использовали для иммунизации животных химерный пептид слияния ВИЧ-1 и тример ВИЧ в различных комбинациях. В результате удалось создать схему вакцинации, которая была эффективна против 31 % из набора в 208 штаммов ВИЧ. Ожидается, что клинические испытания на людях начнутся во второй половине 2019 года (Ху и др., 2018).

Как уже говорилось, конформационные В-клеточные эпитопы ВИЧ-1 часто формируются липидами и гликанами или их комбинациями (Wu и Kong, 2016; Cerutti и др., 2017; Korber и др., 2017; McCoy и Burton, 2017), затрудняющими дизайн искусственных иммуногенов, способных индуцировать необходимый В-клеточный ответ. Решить проблему можно с помощью технологии фагового дисплея, позволяющей отбирать линейные пептиды-имитаторы конформационных антигенных детерминант. Наиболее подходящий формат фагового дисплея для решения такой задачи – это использование пептидных библиотек на основе нитчатых бактериофагов (общая схема исследования представлена на рисунке 3). Эта технология является высокоэффективным инструментом селекции пептидных лигандов для антител, узнающих как линейные, так и конформационные эпитопы (Scott и др., 1992). За последние годы с использованием данной технологии был охарактеризован ряд антител с широкой нейтрализующей активностью в отношении ВИЧ-1 (Zwick и др., 2001;

Tumanova и др., 2002; Tumanova и др., 2003; Menendez и др., 2008; Zhu и др., 2011; Karpenko и др., 2012; Gazarian и др., 2013; Чикаев и др., 2013).

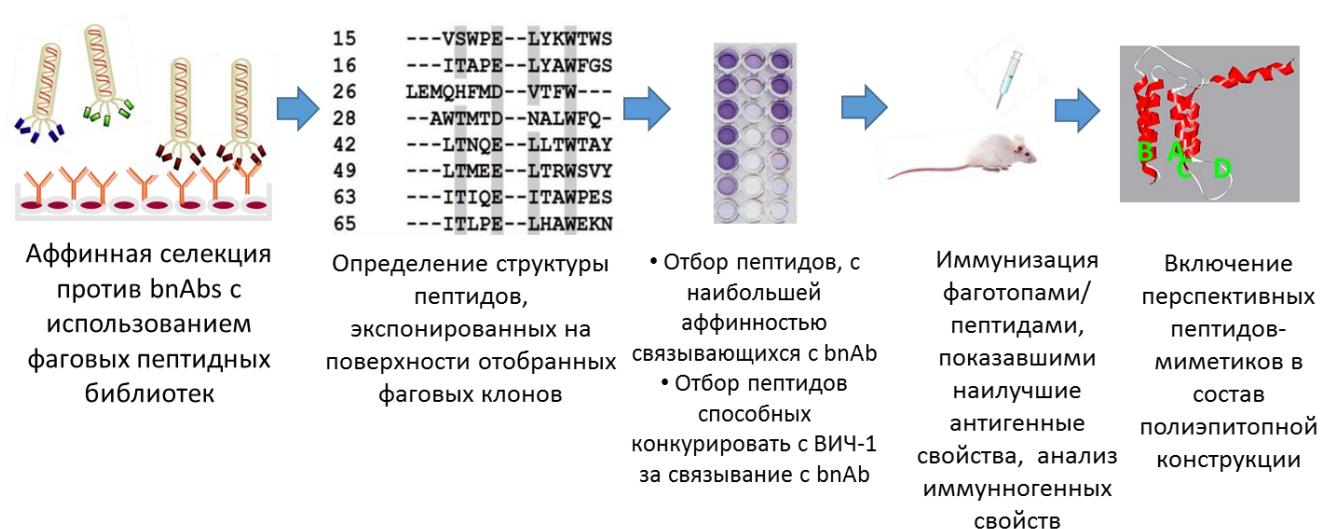


Рисунок 3. Общая схема получения имитаторов конформационных антигенных детерминант белков ВИЧ-1 и их использование для конструирования полиэпитопных В-клеточных иммуногенов

Известно, что индивидуальные пептиды-имитаторы В-клеточных эпитопов слабо иммуногенны. Для создания конструкции, призванной обеспечить оптимальное распознавание иммунной системой всех ее компонентов, необходимо объединение предсказанных или экспериментально выявленных В- и Th-эпитопов в единую молекулу (Мойса, 2011).

Этот принцип был использован во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» для конструирования искусственного четырех- α -спирального полиэпитопного белка-иммуногена TBI (T- and B-cell epitopes containing immunogen) с заданной третичной структурой (Eroshkin и др., 1995). В качестве блоков для создания иммуногенов использовались четыре Th-клеточных эпитопа (амфипатические α -спирали) и пять В-клеточных эпитопов (области с подвижными гидрофильными петлями) (Eroshkin и др., 1993; Eroshkin и др., 1995). Рекомбинантный белок TBI был способен формировать кристаллы, что было впервые показано для искусственного белка с предсказанной третичной структурой (Михайлов и др., 1999). Известно, что только природные белки способны к кристаллизации,

следовательно, можно предположить, что белок ТВІ по своей структуре подобен природным белкам.

У мышей и обезьян *Macaque rhesus*, иммунизированных ТВІ, формировался как клеточный, так и гуморальный ответ к ВИЧ-1. Было показано, что индуцированные ТВІ антитела обладали вируснейтрализующей активностью в отношении ВИЧ-1. Как уже отмечалось выше, белок ТВІ вошел в состав кандидатной вакцины «КомбиВИЧвак», успешно прошедшей I фазу клинических испытаний (Карпенко и др., 2016).

1.6 Заключение

Необычайное генетическое разнообразие ВИЧ-1 и, следовательно, его экстремальное антигенное разнообразие требуют при создании вакцины обеспечить иммунный ответ не только специфических антител против ВИЧ в целом, но и в обязательном порядке обеспечить синтез антител, которые обладают активностью против множества циркулирующих штаммов (Klein и др., 2013; Mascola и Haynes, 2013; van Gils и Sanders, 2013; van Gils и Sanders, 2014; Burton и Mascola, 2015). Эти широконейтрализующие антитела появляются примерно у 20–30 % ВИЧ-1-инфицированных людей, что является важным обоснованием состоятельности вакцинной концепции (Binley и др., 2008; Simek и др., 2009; van Gils и др., 2009; Euler и др., 2010; Hraber и др., 2014).

Таким образом, гуморальная иммунная система человека, безусловно, способна к продукции bNAbs против ВИЧ-1. Дело остается за «малым» – создать иммуноген, способный индуцировать такие антитела. При этом необходимо использовать как конформационные эпитопы bNAbs, так и линейные эпитопы bNAbs из нескольких подтипов ВИЧ-1, которые следует объединять в виде мозаичной (полиэпитопной) вакцины. Конечно, помимо bNAbs следует приложить усилия для включения других консервативных эпитопов В-клеток, а также Т-клеточные эпитопы, вызывающие сильные и широкие анти-ВИЧ-полифункциональные Т-клеточные ответы и анти-ВИЧ-CD8⁺ и CD4⁺ ЦТЛ.

2. Материалы и методы

2.1 Основные компоненты для приготовления питательных сред, реактивы, реагенты и прочие материалы

Агар (Difco, США), агароза (Bio-Rad, США), акриламид (Sigma, США), ампициллин (Биосинтез, Россия), бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma, США), бактотриптон (Difco, США), бромфеноловый синий (Sigma-Aldrich, США), бромистый этидий (Serva, Германия), глицерол (Panreac, США), глицин (Bio-Rad, США), диметилформамид (DMF) (Sigma-Aldrich, США), диметилсульфоксид (DMSO) (Sigma-Aldrich, США), дрожжевой экстракт (Difco, США), казеин (Sigma, США), конъюгаты антител кролика против антител человека со щелочной фосфатазой (Sigma, США), конъюгаты антител кролика против антител мыши со щелочной фосфатазой и пероксидазой хрена (Sigma, США), конъюгаты антител козы против IgG кролика со щелочной фосфатазой и с пероксидазой хрена (Sigma, США), кумасси R-250 (Serva, Германия), изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (Медиген, Россия), имидазол (Panreac, США), N,N-метиленбисакриламид (Sigma, США), мочевины (ICN Pharmaceuticals, США), натрия хлорид (Хеликон, Россия), нитротетразолиевый синий (NBT) (Thermo Scientific, США), пептон казеиновый (Fluka, Швейцария), персульфат аммония (Thermo Scientific, США), полный агар (Difco, США), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) (Thermo Scientific, США), твин-20 (Tween-20) (ICN Biomedicals, США), триптон (Difco, США), трис (гидроксиметил)аминометан (трис) (Amresco, США), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Amresco, США), 5-бром-4-хлор-3-индолил-фосфат (BCIP) (Thermo Scientific, США), 3,3',5,5'-Тетраметилбензидин, ТМБ (Amresco, США), 5-бром-3-индолил фосфат, (BIP) (Sigma, США), 2-меркаптоэтанол (Serva, Германия), нитроцеллюлозные фильтры Hybond-C (Amersham, Великобритания), белок А-агароза (BioVision, США), Ni-NTA агароза (Qiagen, Германия), CL-6B сефароза (Sigma, США).

Все остальные реактивы были произведены в ВО «Реахим» и имели квалификацию «ос.ч» и «чда».

Наборы для выделения ДНК

Наборы производства «Евроген» (Россия): набор для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Standard, набор для выделения и очистки плазмидной ДНК из культуры *E. coli* Plasmid Miniprep. Наборы производства Qiagen (Германия) EndoFree Plasmid Giga Kit для выделения особо чистой плазмидной ДНК из большого объема бактериальной массы.

Питательные среды и компоненты для работы с эукариотическими клетками

Питательная среда DMEM без L-глутамина; L-глутамин (Sigma, США; Вектор, Россия); фетальная бычья сыворотка (Gibco, США); раствор трипсина-версена (1:1) (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия); MATra-A (PromoKine, Германия); 5×буфер для лизиса клеточной культуры (Promega, США); реагент для анализа активности люциферазы, LAR (Promega, США).

Питательные среды для работы с бактериями

LB-бульон, на 1 л: триптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 5 г, pH 7,5 – 7,6;

YT×2, на 1 л: триптон – 16 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 5 г, pH 7,5;

SOC – среда, на 1 л: триптон – 20 г, дрожжевой экстракт – 5,5 г, 0,01 М NaCl, 0,01 М KCl, 0,02 М глюкозы, 0,02 М MgCl₂;

SOB – среда, на 1 л: триптон – 20 г, дрожжевой экстракт – 5,5 г, 0,01 М NaCl, 0,01 М KCl, 0,02 М MgCl₂;

Агаризованная среда: LB-бульон, 1,8 % агара.

Все питательные среды стерилизовали путем автоклавирования.

Буферы и растворы

ТАЕ: Трис-HCl – 40 мМ; ацетат натрия – 20 мМ; ЭДТА – 2 мМ; pH 8,0;

PBS: NaCl – 150 мМ; KCl – 2,7 мМ; Na₂HPO₄ – 10 мМ; KH₂PO₄ – 1,7 мМ; pH 7,4;

PBS-T (0,05 %): 200 мл PBS, 100 мкл Tween-20;

CaCl₂: 50 mM CaCl₂, 10 mM трис-HCl, pH 8,0;

Трис-глициновый буфер: 25 mM трис pH 8,3, 192 mM глицин, 0,1 % SDS;

1,5 M Трис-HCl, pH 8,8;

0,5 M Трис-HCl, pH 6,8;

Буфер для переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану – 38 mM трис-HCl, 48 mM глицин (pH 8,3), 0,05 % SDS, 20 % этанол.

Раствор для нанесения ДНК – 0,25 %-й бромфеноловый синий, 0,25 %-й ксиленианол, 50 %-й водный раствор глицерина; 44 % раствор акриламида; 30 % раствор бисакриламида, раствор бромистого этидия (10 мг/мл).

При необходимости растворы стерилизовали путем фильтрации через мембранный фильтр 0,45 мкм (TPP, Швейцария).

Адьюванты

В работе были использованы: полный и неполный адьюванты Фрейнда (Sigma, США).

Ферменты и маркеры молекулярных масс ДНК и белков

В работе были использованы: ДНК-лигаза бактериофага T4; *Tag*-полимераза, эндонуклеазы рестрикции: *Xba*I, *Fau*NDI, *Eco*RI, *Zsp*2I, *Kpn*I, *Sfr*274I, маркер длин фрагментов ДНК M12, маркер молекулярной массы белков M31 (СибЭнзим, Россия).

Олигонуклеотиды

Для клонирования использовались следующие пары олигонуклеотидов:

Для клонирования пептида имитатора антитела VRC01 в составе HBcAg:

F: 5'-TCGATTTGCTCTTGGACCCTGCTGGGTTATTGC-3'

R: 5'-TCGAGCAATAACCCAGCAGGGTCCAAGAGCAAA-3'

Для клонирования MPER в составе TBI по сайтам рестрикции *Eco*RI и *Zsp*2I:

F: 5'-AATTGAACTGCTGGAACTGGATAAATGGGCGAGCCTGGCGAACTGGTTTATTATTACCAACCTGCTGTGGCTGATTAAGACCATGCA-3'

R: 5'-TGGTCTTAATCAGCCACAGCAGGTTGGTAATAATAAACAGTTCCGCCAGGCTCGCCCATTTATCCAGTTCCAGCAGTTC-3'

Для клонирования MPER в составе TBI по сайтам рестрикции *KpnI* и *Sfr274I*:

F: 5'- GGAAATTGCGCTGCTGCTGCTGGATGCGTGGGCGAGCCTGTGGA
ACTGGTTTGATATTACCAACTGGCTGTGGTATATTGGCAGCGGCCTCGA
GG-3'

R: 5'- TCGACCTCGAGGCCGCTGCCAATATACCACAGCCAGTTGGTAAT
ATCAAACCAGTTCCACAGGCTCGCCACGCATCCAGCAGCAGCAGCGCAAT
TTCCGTAC-3'

Культуры эукариотических клеток

Культуры клеток TZM-bl (JC53-bl) (№8129) и U87.CD4.CCR5 (№ 4035) были получены в рамках программы предоставления реактивов NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (США).

Культура клеток НЕК 293T/17 была предоставлена отделом «Коллекции микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия).

Штаммы *Escherichia coli*:

BL21 (*endA1 hsdR supE sbcB1 thi-1 strA Δ(lac-proAB)* [F', *traD36, proAB, lacI^qΔM15*];

JM103 (*endA1 glnV44 sbcBC rpsL thi-1 Δ(lac-proAB)* F'[*traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15*]);

DH5αF' (*supE44 ΔlacU169 (ø80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* F'[*traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15*];

Stbl2 F- *mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1 lon gyrA96 thi supE44 relA1 λ- Δ(lac-proAB)*.

Штаммы были предоставлены отделом «Коллекции микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия).

Плазмиды

В работе использовали следующие плазмиды и их производные: плаزمида pET21a (Novagene, США); плазмида pcDNA3.1 (Invitrogen, США); плазмиды pSG3deltaEnv, pSF162.LS, p6535.3, pTRO.11, pTRJO4551.58, pQHO692.42, pSVIII-

92BR025.9 (№ 3083) были получены по программе предоставления реагентов для исследования СПИД NIH AIDS Reagent Program, США; плазмиды pUC-HBcAg и pTBI были получены из коллекции плазмид музея отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия).

Моноклональные антитела

МКА 29F2 были любезно предоставлены Порываевой В. А.

МКА к HBcAg были любезно предоставлены Рязанкиным И. В.

МКА 4E10 (№ 10091), VRC01 (№ 12033), 10E8 (№12294) и 2F5 (№ 1475) были получены в рамках программы предоставления реактивов NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (США).

Пептиды, использованные в конкурентном анализе

Пептиды 10E8 [NWFNITNWLWYIK]; 2F5 [NEQELLELDKWASLWNK] и VRC01 [VSWPELYKWTWS] были синтезированы Synpeptide Co., Ltd (Шанхай, Китай).

Лабораторные животные

В работе использовали самцов мышей линии BALB/c (генотип H-2d) весом 16–18 г и самок кроликов породы шиншилла весом 1,5–2 кг, которые были предоставлены питомником ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия).

2.2 Методы

2.2.1 Конструирование генов рекомбинантных белков TBI_tag и nTBI

При проектировании белков TBI_tag и nTBI за основу был взят ранее разработанный белок TBI (Eroshkin и др., 1995). Оптимизацию кодоновых составов генов TBI_tag и nTBI проводили с помощью онлайн-ресурса (GenScript, 2018). Гены, кодирующие спроектированные белки TBI_tag и nTBI, были синтезированы компанией «Евроген» (Москва, Россия) и затем клонированы в составе плазмидного вектора pET21a (Novagen) по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции *Xba*I и *Sfr*274I (СибЭнзим, Россия). Реакции гидролиза и лигирования ДНК проводили при параметрах, рекомендованных производителем ферментов. Анализ продуктов реакции проводили с помощью горизонтального электрофореза

в 1 % агарозном геле. Структура целевых плазмид pET-nTBI и pET-TBI_tag была подтверждена секвенированием в ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск, Россия).

2.2.2 Нарботка и очистка рекомбинантных белков nTBI и TBI_tag

Бактериальные штаммы-продуценты белков nTBI и TBI_tag получали путем трансформации химически компетентных клеток *E. coli* BL21 плазмидами pET-nTBI и pET-TBI_tag. Для наращивания биомассы отдельные колонии клеток *E. coli* BL21, несущих плазмиды pET-nTBI либо pET-TBI_tag, культивировали в среде LB с ампициллином (50 мкг/мл) в течение 16 часов. Культуру добавляли к 150 мл среды YT×2 (50 мкг/мл ампицилина) в соотношении 1:100 и культивировали при 37 °C и 160 об/мин до достижения суспензией клеток $OP_{600} = 0,5$. Экспрессию генов nTBI и TBI_tag индуцировали добавлением 100 мкл 1 М изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (Медиген, Россия). Бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 6000 g 5 мин при 4 °C (Beckman Coulter Avanti J-30I, США). Биомассу разрушали на льду с использованием ультразвукового дезинтегратора Soniprep 150 Plus (MSE, Великобритания). Дебрис осаждали центрифугированием и растворяли в 8 М мочеvine. Рекомбинантные белки очищали с помощью металл-хелатной хроматографии на колонке с Ni-NTA (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Очищенные препараты иммуногенов диализовали против физиологического раствора. Степень очистки целевого белка оценивали с помощью электрофореза в 15 % ПААГ с последующей фиксацией и окрашиванием кумасси G250. Количественный анализ содержания белков осуществляли путём сканирования окрашенных полиакриламидных гелей и анализа полос с использованием компьютерной программы Gel-pro analyzer Ver.4.5 (Gel-Pro, 2018).

2.2.3 Вестерн-блот-анализ белков nTBI и TBI_tag

Вестерн-блот-анализ проводили с использованием системы SNAP i.d. (Millipore, США). После электрофореза в ПААГ белки nTBI и TBI_tag переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, Великобритания) при силе тока 100

мА на приборе для полусухого переноса Semi-dry (Биоклон, Россия). Свободную поверхность мембраны блокировали блокирующим буфером (PBS с 1 % БСА) в течение 5 мин и промывали 3 раза промывочным буфером (PBS с 0,1 % Tween 20). После промывки на мембраны наносили МКА VRC01, 10E8, 2F5 или 29F2, разбавленные в блокирующем буфере (1:10 000) и инкубировали в течение 10 мин. Мембраны промывали 3 раза промывочным буфером. Далее, в зависимости от видовой принадлежности первичных антител, к мембране добавляли конъюгат антител кролика против антител мыши (или человека) с щелочной фосфатазой, разбавленные в блокирующем буфере (1:10 000), и инкубировали в течение 10 мин. После этого мембраны промывали 5 раз промывочным буфером. Визуализацию иммунного комплекса проводили добавлением NBT/BCIP-субстратного раствора.

2.2.4 Иммунизация животных белками nTbI и TbI_tag

В экспериментах использовали 4-месячных самок кроликов (вес 1,6–2 кг) породы шиншилла. Животных содержали в отдельных клетках (виварий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) на стандартном рационе со свободным доступом к пище и воде. Эксперименты были одобрены на заседании Биоэтической комиссии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 2 от 17.02.2017 г.).

Животные были случайным образом разделены на две группы (3 кролика в каждой группе). Перед иммунизацией у животных был произведен забор образцов крови и получена сыворотка, которая использовалась в качестве отрицательного контроля. Первая группа кроликов была иммунизирована белком nTbI, вторая – TbI_tag. Препараты белков вводили трехкратно на 1-й, 14-й и 28-й день. При первой иммунизации кроликам подкожно вводили по 500 мкг nTbI либо TbI_tag с полным адъювантом Фрейнда, при второй – по 500 мкг белка в комплексе с неполным адъювантом Фрейнда, при третьей – по 500 мкг белка без адъюванта. Через две недели после последней иммунизации производился забор образцов крови, из которых получали сыворотки и анализировали их на наличие специфических антител.

2.2.5 Очистка фракций суммарных IgG кроликов, иммунизированных белками nTBI и TBI_tag

Получение очищенных IgG из сывороток кроликов проводили путем аффинной хроматографии на белке A (BioVision, США) в соответствии с протоколом производителя. Очищенные препараты IgG диализовали против PBS. Степень очистки IgG оценивали с помощью электрофореза по Лэммли в 15 % ПААГ с последующей фиксацией и окрашиванием кумасси G250. Очищенные препараты IgG хранили при – 20 °С.

2.2.6 Иммуноферментный анализ сывороток крови кроликов, иммунизированных белками nTBI и TBI_tag

Специфическую активность сывороток кроликов, иммунизированных белками nTBI и TBI_tag (или соответствующих очищенных фракций IgG), оценивали с помощью ИФА. Белки nTBI или TBI_tag (5 мкг/мл) сорбировали в лунках 96-луночного планшета (Greiner bio one, Германия), свободные поверхности лунок блокировали БСА. После этого вносили образцы сывороток в пятикратном последовательном разведении для определения титра антител в каждом образце. Затем в лунки добавляли антитела козы против антител кроликов (разбавленные в PBS 1:10 000), конъюгированные с щелочной фосфатазой (Sigma, США), после каждой процедуры планшет инкубировали при 37 °С, затем отмывали от несвязавшихся компонентов и вносили раствор субстрата BCIP/NBT (Sigma, США). Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм на ИФА-ридере (Model 680 Micro plate reader, Bio Rad, США). Все эксперименты проводили в трех повторах. Для подтверждения того, что после очистки IgG сохраняют свои функциональные свойства, был проведен аналогичный анализ очищенных фракций IgG, полученных из сывороток животных, иммунизированных nTBI и TBI_tag. Все эксперименты проводили в трех повторах. При определении титра сывороток, максимальным разведением считали разведение, значение ОП которого превышало в два раза ОП отрицательного контроля (при том же разведении).

2.2.7 New Lav Blot 1-анализ сывороток крови кроликов, иммунизированных белками nTbI и TbI_tag

Наличие антител, специфических к белкам ВИЧ-1, определяли с помощью тест-системы New Lav Blot 1 (Bio-Rad, Франция) в соответствии с протоколом производителя.

2.2.8 Получение Env-псевдовирусов

Референсная панель рекомбинантных плазмид, содержащих полноразмерные гены env ВИЧ-1 подтипа В (Li et al., 2005), а именно SF162.LS (Stamatatos и др., 2000), 6535 клон 3 (Cat # 11017), QH0692 (Cat # 11018), TRO.11 (Cat # 11023), PV04 (Cat # 11022), подтипа С pSVIII-92BR025.9 (№ 3083) и env-дефектная плазида pSG3Δenv (Wei и др., 2002), была получена в рамках программы предоставления реактивов NIH AIDS Reagent, Division of AIDS, NIAID, NIH. Плазмиды pHGPMΔMD-1, кодирующие GP вируса Марбурга, были сконструированы в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Полежаева и Щербаков, 2017).

Псевдовирусы получали котрансфекцией клеток 293T/17 плазмидами pcDNA3.1/V5, несущими различные полноразмерные гены gp160, и плазмидой pSG3Δenv, несущей все остальные гены ВИЧ-1, за исключением gp160. Процедуру проводили с использованием реагента MATra-A (PromoKine, Германия): на 3 мкл MATra-A брали по 300 нг плазмид pEnv и pSG3Δenv и смешивали с 200 мкл среды. Смесь тщательно перемешивали, инкубировали 20 мин при комнатной температуре и переносили в 24-луночный планшет к монослою клеток 293T/17, инкубировали 15 мин на магнитном штативе при 25 °С. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор и инкубировали при 37 °С. Через 6 часов производили смену среды на свежую, и снова инкубировали. Через 48 ч инкубации отбирали культуральную среду. От клеток псевдовирусы отделяли путем низкоскоростного центрифугирования с последующей фильтрацией через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Полученную псевдовирус-содержащую надосадочную жидкость хранили при –80 °С в среде DMEM, содержащей 20 % фетальной бычьей сыворотки.

50 %-ю инфекционную дозу культуры (TCID₅₀) каждого псевдовируса, необходимую для использования в реакции вируснейтрализации рассчитывали по методу Рида и Мюнча.

2.2.9 Нейтрализующий анализ

Нейтрализующую активность очищенных IgG определяли в реакции вируснейтрализации с использованием env-псевдовирусов ВИЧ-1. Эксперимент проводили согласно протоколу Монтефиори (Montefiori, 2009). В лунки планшета, содержащие 150 мкл культуральной среды, вносились последовательные пятикратные разведения анализируемых IgG (с титрами от 1:40 до 1:625000) объемом 11 мкл. В качестве отрицательного контроля (фоновый люминесцентный сигнал) использовали один ряд лунок, содержащих только среду (без добавления антисывороток). Затем в каждую лунку за исключением контрольного ряда добавляли по 50 мкл суспензии псевдовирусов с концентрацией, соответствующей значению 200 TCID₅₀/100 мкл. Далее во все лунки вносили 100 мкл суспензии клеток TZM-bl с концентрацией 100000 клеток/мл, инкубировали 48 ч при 37°C. После инкубации из лунок отбирали по 150 мкл их содержимого и добавляли реактив для оценки экспрессии гена светлячковой люциферазы в клетках млекопитающих. Уровень люминесценции измеряли с помощью люминометра LuMate (Awareness Technology Inc., США) при длине волны 482 нм.

Помимо env-псевдовирусов, для оценки вируснейтрализующей активности очищенных фракций IgG использовался молекулярный клон ВИЧ-1 92BR025 (субтип C, уровень устойчивости 1B) и клетки-мишени U87.CD4.CCR5. Постановку анализа проводили согласно протоколу, описанному ранее (Medina-Ramirez и др., 2011; Gonzalez и др., 2018).

Среднее значение IC₅₀ вычисляли с помощью программы GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, США) по результатам трех параллельных измерений и выражали в концентрации антител, при которой происходит снижение люминесцентного сигнала на 50 %, используя метод нелинейной регрессии.

2.2.10 Конкурентный анализ

Конкурентный анализ проводили как описано ранее (Chikaev и др., 2015). Синтез пептидов 10E8 [NWFNITNWLWYIK], 2F5 [NEQELLELDKWASLWNK] и VRC01 [VSWPELYKWTWS] был проведен фирмой Synpeptide Co., Ltd (Шанхай, Китай), чистота препаратов составляла $\geq 80\%$. Был проведен анализ способности вышеуказанных пептидов конкурировать с псевдовиром SF162 ВИЧ-1 за связывание с IgG, выделенными из сывороток крови животных иммунизированных, TBI_tag, или nTBI, и с МКА 10E8, 2F5 и VRC01.

Концентрация стокового раствора пептидов составляла 2 мг/мл. Готовили смесь соответствующего пептида и антител (1:1 по объему), инкубировали в течение 30 мин при 37°C, затем вносили суспензию псевдовиром SF162 (200 TCID₅₀), и полученную смесь инкубировали еще в течение часа при 37 °C. Затем к смеси пептида, антитела и псевдовиром SF162, добавляли индикаторные клетки TZM-bl (1:1 по объему). Активность люциферазы измеряли через 48 ч после инфицирования с использованием субстрата люциферазы (Promega, США).

Неспецифическое ингибирование взаимодействия псевдовиром SF162 с клетками мишенями в присутствии пептидов (без добавления антител) анализировали в аналогичных условиях (отрицательный контроль).

Ингибирующее действие пептидов определяли относительно данных log₁₀ RLU, полученных при нейтрализации псевдовиром SF162 соответствующими антителами, без добавления пептидов и данных log₁₀ RLU, полученных с добавлением пептидов.

2.2.11 Статистический анализ

Сравнение результатов, полученных с различными пептидами и антителами, проводили с помощью двухстороннего U-теста Манна-Уитни. Множественная коррекция тестирования проводилась в соответствии с процедурой Беньямини-Хохберга (FDR). Статистический анализ и составление графика проводились с использованием R – языка и среды для статистического анализа с открытым исходным кодом (v. 3.3.2) (R_Core_Team, 2016).

2.2.12 Конструирование иммуногена HBcAg-mimicVRC01

В качестве вектора, несущего ген HBcAg, была использована полученная ранее плазида pUC-HBcAg (Веремейко и др., 2007). Конструирование рекомбинантной плазмиды, несущей ген HbcAg со встроенным пептидом имитатором эпитопа МКА VRC01 (аминокислотная последовательность пептида – CSWTLLGYC), проводили путем клонирования олигонуклеотидного дуплекса, кодирующего данный пептид, по уникальному сайту рестрикции *Sfr274I*. Структура целевой плазмиды была подтверждена секвенированием.

2.2.13 Наработка и очистка белков HBcAg и HBcAg-mimicVRC01

Для наработки белков HBcAg и HBcAg-mimicVRC01 клетки *E. coli* штамма JM103, трансформированные плазмидами pUC/HBcAg и pUC/HBcAg-mimicVRC01, культивировали в среде YT×2 до достижения ОП₆₀₀ = 1, после этого добавляли индуктор ИПТГ и продолжали культивирование в течение 4 ч. Полученные биомассы осаждали центрифугированием, суспендировали в натрий-фосфатном буфере (PBS, pH 8) и разрушали клетки с использованием ультразвукового гомогенизатора Soniprep 150 Plus (MSE, Великобритания). Тельца включения отделяли центрифугированием при 16 000 об/мин в течение 15 мин при 4 °C (Beckman Coulter Avanti J-30I, США). Целевой белок из телец включения экстрагировали в буфере на основе PBS, содержащим 8М мочевины. После этого проводили рефолдинг целевого белка диализом против пяти смен PBS с понижающейся концентрацией мочевины (6, 4, 2, 1 М), последний этап диализа проводили против PBS без мочевины. Для дальнейшей очистки проводили гель-фильтрацию на сефарозе CL-6B. Степень очистки целевого белка оценивали с помощью электрофореза по Лэммли в 15 % ПААГ с последующей фиксацией и окрашиванием кумасси G250.

2.2.14 Вестерн-блот-анализ белков HBcAg и HBcAg-mimicVRC01

Вестерн-блот-анализ проводили по методике, описанной в пункте 2.2.3. Разница заключалась в иммунодетекции белков HBcAg и HBcAg-mimicVRC01, которую осуществляли с использованием анти-HBcAg моноклональных мышиных антител, любезно предоставленных Рязанкиным И.А. Специфически

связавшиеся антитела визуализировали с помощью меченых щелочной фосфатазой антител кролика против IgG мыши и хромогенного субстрата BCIP/NBT (Sigma, США).

2.2.15 Дот-блот-анализ белков HBcAg и HBcAg-mimicVRC01

Для анализа антигенных свойств имитатора эпитопа VRC01 в составе HBcAg был проведен дот-блот-анализ с использованием МКА VRC01. Дот-блот-анализ проводили с использованием системы SNAP i.d. (Millipore, США). На нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, Австрия) наносили в четыре точки по 1 мкл двукратные последовательные разведения белков HBcAg и HBcAg-mimicVRC01 (стартовая концентрация 0,3 мг/мл), затем свободные участки мембраны блокировали буфером (PBS с 1 % BSA) и промывали 3 раза буфером (PBS с 0,1 % Tween 20). Мембрану помещали в раствор МКА VRC01, разбавленных в блокирующем буфере в соотношении 1:10 000, инкубировали в течение 10 мин при 25 °С, после этого отмывали 3 раза промывочным буфером. Далее мембраны инкубировали 10 мин с антителами кролика против IgG человека (Sigma, США), конъюгированные с щелочной фосфатазой, разбавленные в блокирующем буфере в соотношении 1:5000, затем промывали 5 раз буфером (PBS с 0,1 % Tween 20). Визуализацию иммунного комплекса проводили добавлением NBT/BCIP-субстратного раствора (Sigma, США).

2.2.16 Электронная микроскопия частиц HBcAg

Исследование проводилось в отделе микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Для электронной микроскопии препараты HBcAg и HBcAg-mimicVRC01 адсорбировали на сеточках с формваровой подложкой в течение 1–2 мин. Был применен метод негативного контрастирования образцов 1 % раствором уранилацетата. Исследование проводили с использованием электронного микроскопа JEM100С (Jeol, Япония).

2.2.17 Получение и анализ сывороток животных, иммунизированных белками HBcAg и HBcAg-mimicVRC01

В экспериментах использовали мышей линии BALB/c (генотип H-2d) весом 12–15 г (самцы). Животных содержали в клетках (виварий ФБУН ГНЦ ВБ

«Вектор» Роспотребнадзора) на стандартном рационе со свободным доступом к пище и воде. Эксперименты были одобрены на заседании Биоэтической комиссии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 1 от 23.01.2017 г.).

Животные были распределены на две группы, по 10 особей в каждой группе. Первой группе внутримышечно вводили очищенный рекомбинантный белок HBsAg-mimicVRC01 трехкратно с интервалом в одну неделю. Вторая группа мышей служила в качестве отрицательного контроля, животным вводили препарат HBsAg по схеме, описанной выше. Через неделю после последней иммунизации производился забор образцов крови, из которых получали сыворотку и анализировали на наличие специфических антител. Для анализа использовали суммарный пул иммунных сывороток.

ИФА проводили как описано в пункте 2.2.6, за исключением того, что в качестве антигенов сорбировали белки HBsAg и HBsAg-mimicVRC01, а в качестве вторых антител использовали конъюгат антитела кролика против IgG мыши (разбавленные в PBS 1:10000), конъюгированный с пероксидазой хрена (Sigma, США) и субстрат ТМВ (Amresco, США). Измерение оптической плотности проводили с помощью ИФА-ридера (Model 680 Micro plate reader, Bio Rad, США) при длине волны 450 нм.

Наличие вируснейтрализующей активности очищенных IgG определяли путем постановки реакции вирус-нейтрализации с использованием рекомбинантного штамма ВИЧ-1 92BR025 и клеток мишеней U87.CD4.CCR5, как описано в (Medina-Ramirez и др., 2011; Gonzalez и др., 2018).

2.2.18 Конструирование гена химерного белка YkuJ-MPER

Белок-носитель YkuJ был выбран с помощью поиска в классификаторе белковых структур SCOP (SCOP, 2009). Анализ гомологии аминокислотной последовательности YkuJ с белками человека проводили с использованием базы данных UniProt (UniProt, 2018) и программы BLAST (BLAST, 2018).

При проектировании белка YkuJ-MPER N- и C- концы белка-носителя были частично заменены на консенсусные последовательности MPER региона ВИЧ-1 субтипа В. В тех позициях, которые недоступны для антител, аминокислотные

остатки не подвергали изменениям, чтобы максимально сохранить исходную структуру YkuJ.

В состав нуклеотидной последовательности гена YkuJ-MPER были заложены уникальные сайты рестрикции *NdeI*, *BstBI*, *BspDI*, *XhoI* (классификация NEB), фланкирующие нуклеотидную последовательность участка MPER, для возможности замены этих участков на MPER других генетических вариантов ВИЧ-1, а также для клонирования гена в составе плазмидных векторов. Ген химерного белка YkuJ-MPER был синтезирован и клонирован в составе плазмидного вектора pET21a по сайтам рестрикции *FauNDI* и *Sfr274I*.

2.2.19 Конструирование гена искусственного белка MPER-TBI

Иммуноген MPER-TBI был получен путем замены участков на С- и N-конце белка TBI_tag (описан в пункте 2.2.1) на участки MPER ВИЧ-1. Для этого проводили последовательное клонирование олигонуклеотидных дуплексов по уникальным сайтам в составе рекомбинантной плазмиды pET-TBI_tag, кодирующей белок TBI_tag. Первый олигонуклеотидный дуплекс, кодирующий MPER, клонировали по сайтам *EcoRI* и *Zsp2I*, второй – по сайтам *KpnI* и *Sfr274I*.

2.2.20 Построение моделей взаимодействия YkuJ-MPER

с Fab-фрагментами антител 10E8, 2F5 и 4E10

Для определения того, что со спроектированным иммуногеном YkuJ-MPER способно связаться одновременно два антитела, были построены модели комплексов YkuJ-MPER и bNAbs 10E8, 4E10, 2F5. Для этого использовались программы Modeller (Modeller, 2018) и PyMOL (PyMOL, 2018).

Модели YkuJ-MPER были построены следующим образом. С помощью программы PyMOL совмещались структуры YkuJ из PDB (2FFG) и структуры фрагментов MPER из комплексов MPER с Fab-фрагментами антител 2F5 (2PR4), 4E10 (2FX8) и 10E8 (4G6F). Результат такого совмещения использовался как шаблон при моделировании по гомологии в программе Modeller. Затем для проверки возможности соединения YkuJ-MPER с моноклональными антителами на полученные модели с помощью программы PyMOL накладывались соответствующие структуры комплексов MPER с Fab-фрагментами антител.

2.2.21 Нарботка и очистка рекомбинантных белков YkuJ-MPER и MPER-TBI

Рекомбинантные белки YkuJ-MPER и MPER-TBI были наработаны и очищены методами, описанными в пункте 2.2.2. Дополнительную очистку белков и их рефолдинг проводили с помощью диализа против буферов (PBS) со снижающейся концентрацией мочевины (6, 4, 2, 1 М), последний этап диализа проводили против PBS без мочевины.

2.2.22 Дот-блот-анализ белков YkuJ-MPER и MPER-TBI

Для исследования антигенных свойств на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham) наносили в девять точек по 1 мкл двукратных последовательных разведений белков YkuJ-MPER и MPER-TBI (стартовая концентрация 0,2 мг/мл). После этого проводили дот-блот-анализ с использованием VRF 10E8, 4E10, 2F5, как описано в пункте 2.2.14.

2.2.23 Круговой дихроизм

Спектры кругового дихроизма (КД) белков YkuJ-MPER и MPER-TBI были зарегистрированы при 25 °С с использованием термостатируемой 1 мм кюветы на спектрополяриметре J-600 (JASCO, Япония). Все спектры были записаны в диапазоне 195–260 нм с шагом 1 нм и были усреднены после трех измерений. Концентрации образцов в физиологическом растворе были приведены к одинаковой оптической плотности на длине волны 214 нм.

Для определения доли α -спиралей, β -листов, поворотов и неупорядоченной формы экспериментальные кривые описывали расчетным методом фиттинга. Теоретические кривые представляли в виде линейной комбинации спектров различных компонент вторичных структур – базовых спектров, которые были взяты из программы CCA+ (Perczel и др., 1991).

2.2.24 Получение и анализ сывороток животных, иммунизированных белками YkuJ-MPER и MPER-TBI

В экспериментах использовали 4-месячных кроликов-самок (вес 1,6–2 кг) породы шиншилла. Животных содержали в отдельных клетках (виварий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) в условиях содержания на стандартном

рационе со свободным доступом к пище и воде. Эксперименты были одобрены на заседании Биоэтической комиссии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 2 от 17.02.2017 г.).

Животные случайным образом были разделены на две группы (3 кролика в каждой группе). Перед иммунизацией у животных был произведен забор образцов крови и получена сыворотка, которая использовалась в качестве отрицательного контроля. Препараты белков вводили трехкратно на 1-й, 14-й, 28-й, 42-й и 56-й дни. При первой иммунизации кроликам подкожно вводили по 500 мкг YkuJ-MPER либо MPER-TBI с полным адъювантом Фрейнда, при второй – по 500 мкг белка в комплексе с неполным адъювантом Фрейнда, при последующих иммунизациях – по 800 мкг белка без адъюванта. Через две недели после последней иммунизации производился забор образцов крови, из которых получали сыворотки и анализировали их на наличие специфических антител.

ИФА проводили как описано в пункте 2.2.6, за исключением того, что в качестве антигенов сорбировали белки YkuJ-MPER и TBI-MPER (5 мкг/мл), а в качестве вторых антител использовали конъюгат антитела козы против IgG кролика (разбавленные в PBS 1:10000), конъюгированный с пероксидазой хрена (Sigma, США) и субстрат TMB (Amresco, США).

Для статического анализа данных, полученных при анализе способности сывороток перекрестно взаимодействовать с антигенами, не использовавшимися для иммунизации, сравнивали медианные значения ОП для преиммунных сывороток и сывороток после четвертой иммунизации при одном и том же разведении с использованием критерия Вилкоксона. Статистический анализ проводился с использованием пакета R (R_Core_Team, 2016).

3. Результаты и их обсуждение

Раздел «Результаты и их обсуждение» представлен в виде трех частей, исходя из используемых белков-носителей эпитопов bNAbs. Первая часть посвящена получению и анализу антигенных и иммуногенных свойств полиэпитопного ВИЧ-иммуногена nTbI, несущего нативные эпитопы широконейтрализующих антител 10E8, 4E10, 2F5 и имитатор конформационного эпитопа антитела VRC01. Вторая часть – химерному HBsAg, экспонирующему имитатор эпитопа bNAbs VRC01. Третья – получению и анализу антигенных и иммуногенных свойств рекомбинантных белков, несущих участки MPER ВИЧ-1, полученных на основе белков YkuJ и TbI.

3.1 Иммуноген nTbI

Создание иммуногена, способного обеспечить защиту от заражения и развития ВИЧ-инфекции, до сих пор является нерешенной и актуальной задачей. Поскольку для ВИЧ-1 характерна сильная генетическая изменчивость, эффективная вакцина должна обеспечивать защиту от множества различных штаммов вируса (Fauci, 2017; Haynes и Burton, 2017). Решением проблемы могло бы стать создание иммуногена, способного индуцировать ВИЧ-нейтрализующие антитела широкого спектра действия (Haynes и Burton, 2017). В отличие от обычных антител, bNAbs реагируют с консервативными эпитопами, обеспечивая защитный иммунитет против подавляющего большинства штаммов ВИЧ-1 (Shcherbakov и др., 2015; Haynes и Burton, 2017).

Один из подходов к созданию ВИЧ-иммуногенов заключается в конструировании полностью искусственных полиэпитопных белков, включающих протективные Т- и В-клеточные эпитопы из вирусных антигенов. Это позволяет нацелить формирование иммунного ответа на строго определенные протективные эпитопы и одновременно исключает вероятность появления нежелательных детерминант, вызывающих индукцию аутоантител или антител, увеличивающих инфекционность вируса (McMichael и Haynes, 2012; Karpenko и др., 2014; Карпенко и др., 2016; Korber и др., 2017).

При проектировании иммуногена nTBI за основу был взят ранее разработанный А. М. Ерошкиным искусственный белок TBI, который является компонентом кандидатной вакцины «КомбиВИЧвак». Ранее было показано, что TBI может быть использован для презентации имитаторов эпитопов антител 2F5 и 2G12 (Shcherbakova и др., 2016). Блок-схема иммуногенов TBI, TBI_tag и nTBI представлена на рисунке 4.

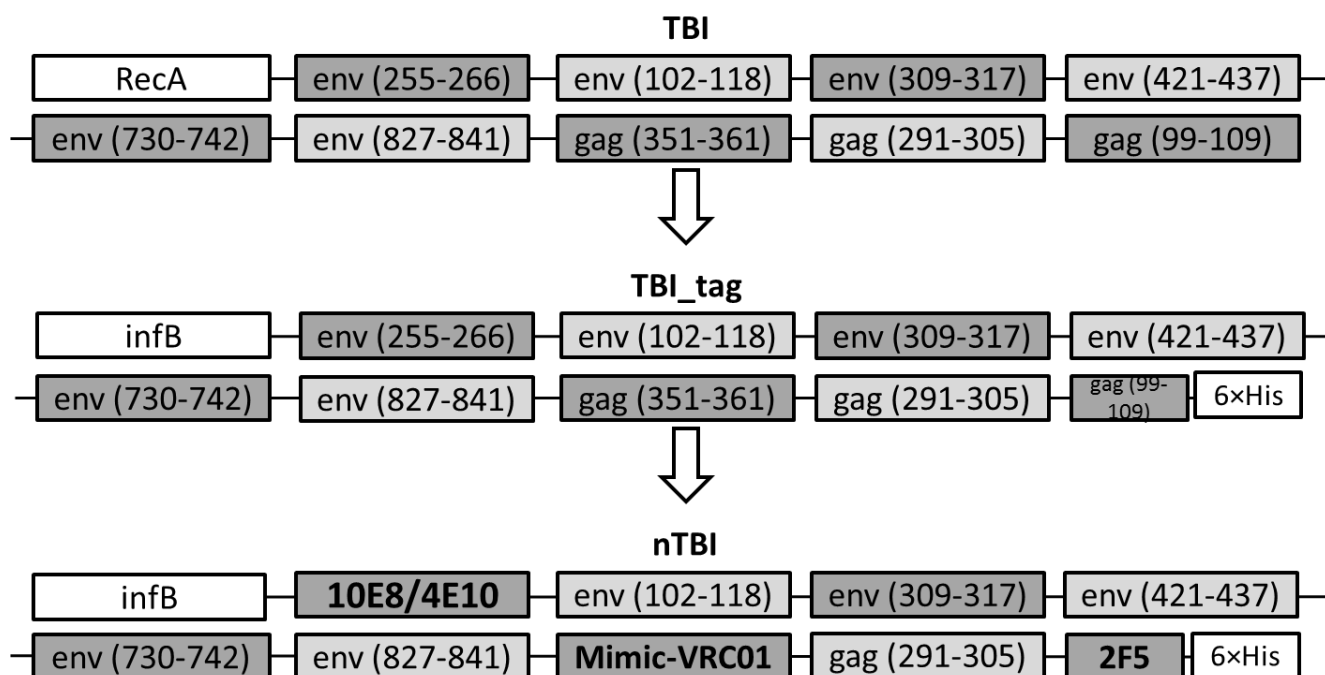


Рисунок 4. Схематическое изображение структуры иммуногенов TBI, TBI_tag и nTBI. Темным фоном выделены В-клеточные эпитопы, светлым фоном – Th-эпитопы. RecA – фрагмент белка *P. mirabilis* RecA. InfB – фрагмент белка-активатора транскрипции *E. coli* InfB. 6 × His – шесть аминокислотных остатков гистидина

Исходный вариант гена, кодирующий белок TBI, находился в составе плазмиды pTBI под контролем индуцибельного промотора RecA *Proteus mirabilis* (Eroshkin и др., 1995). Данная экспрессионная система не позволяла добиться высокого выхода целевого белка. Поэтому в начале работы нами было проведено улучшение бактериального продуцента белка TBI. Для этого была проведена оптимизация кодонного состава гена TBI для эффективной экспрессии в системе *E. coli*. Также из структуры гена TBI был удален фрагмент, кодирующий 20 а.о. белка RecA *P. mirabilis*, и заменен последовательностью, кодирующей фрагмент (7 а.о.) белка-активатора транскрипции InfB *E. coli*. Новый ген (TBI_tag) был

получен путем химического синтеза и клонирован в составе плазмидного вектора pET21a в рамке считывания с последовательностью, кодирующей 6 а.о. гистидина. Ген TBI_tag был получен путем химического синтеза и клонирован в составе плазмидного вектора pET21a в рамке считывания с последовательностью, кодирующей 6 а.о. гистидина. Карта полученной плазмиды представлена на рисунке 5. Блок-схема белка TBI_tag изображена на рисунке 4, его аминокислотная последовательность и предсказанная вторичная структура представлены на рисунке 6. Белок TBI_tag, кодируемый новым геном, состоит из 159 а.о., его рассчитанная изоэлектрическая точка равняется 6,15.

В результате оптимизации структуры гена и смены экспрессионного вектора уровень продукции TBI_tag в клетках *E. coli* значительно увеличился (со 150 до 400 мг на 1 г влажной биомассы) по сравнению с использованием плазмиды pTBI. Полученная экспрессионная конструкция была использована в дальнейшем для получения новых вариантов иммуногенов на основе белка TBI.

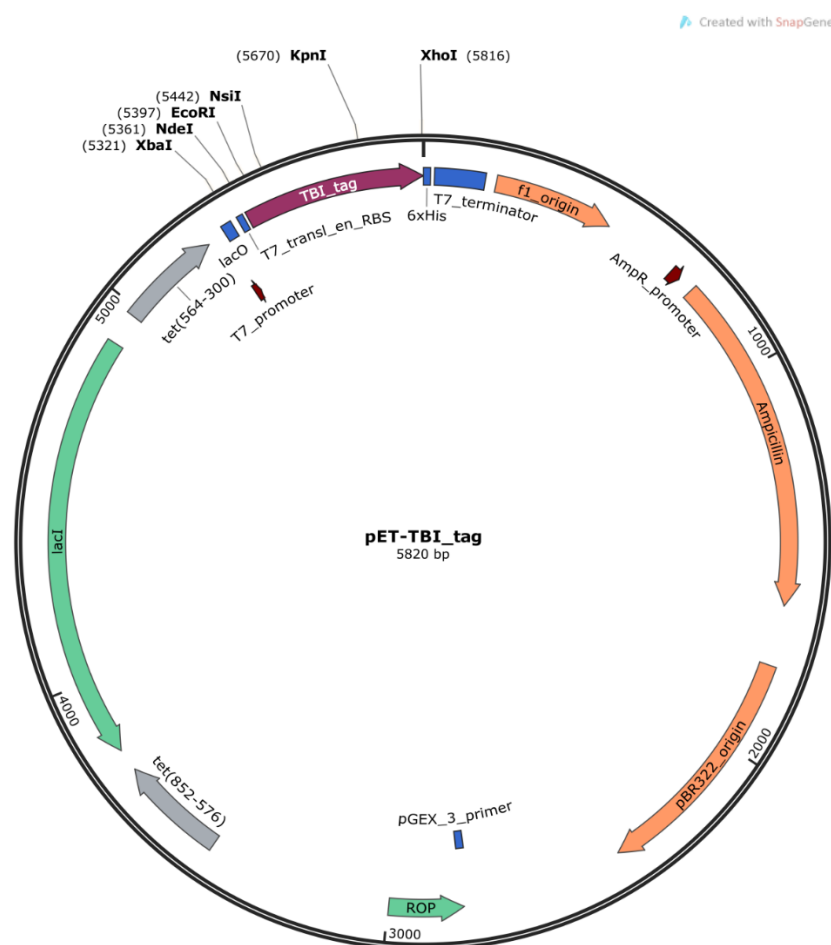


Рисунок 5. Карта плазмиды pET-TBI_tag

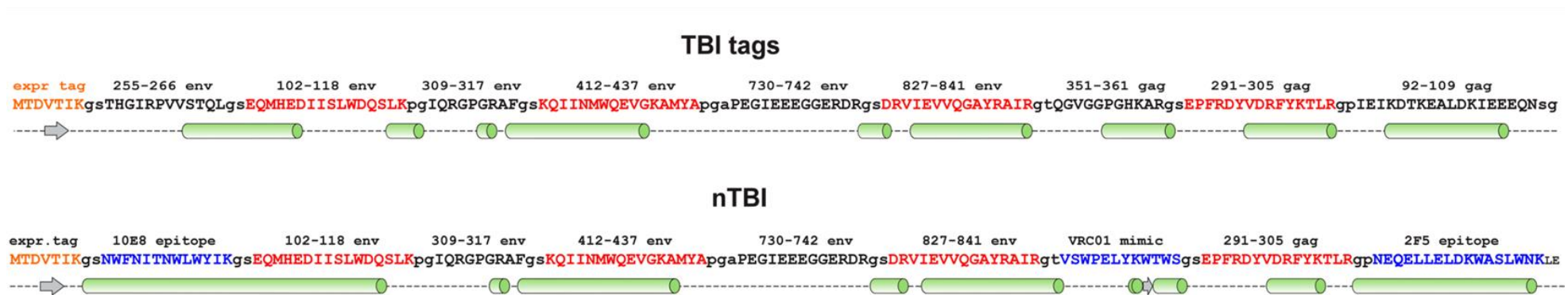


Рисунок 6. Аминокислотная последовательность и модель вторичной структуры белков TBI_tags и nTBI. Модели вторичных структур были получены с помощью программы PSSpred (<https://zhanglab.ccmh.med.umich.edu/PSSpred>). Пунктирной линией обозначены неоформленные структуры, светло-зелеными цилиндрами обозначены α -спирали, серыми стрелками обозначены β -листы. Все белки содержат С-терминальную последовательность из 6 а.о. гистидина

Для улучшения иммуногенных свойств белка TBI_tag были изменены его В-клеточные эпитопы. Ранее в работе Щербаковой и соавт. (Shcherbakova и др., 2016) проводилась замена одного В-клеточного эпитопа, входящего в состав TBI, при этом использовались имитаторы эпитопов антител, которые обладают относительно невысокой нейтрализующей активностью. В данной работе были заменены сразу три В-клеточных эпитопа иммуногена TBI_tag. Последовательности env (255-266) и gag (99-109) в белке TBI_tag были заменены на нативные аминокислотные последовательности, узнаваемые bNAbs 10E8 и 4E10 (NWFNITNWLWYIK) и 2F5 (NEQELLELDKWASLWN). Вместо gag (351-361) в состав белка был включен линейный пептид-имитатор (VSWPELYKWTWS), узнаваемый антителом VRC01, полученный ранее А. Н. Чикаевым с помощью фагового дисплея (Chikaev и др., 2015). Нативный эпитоп VRC01 сформирован дискретным набором а.о., то есть является конформационным. По этой причине в качестве антигенной детерминанты был использован имитатор эпитопа данного антитела. Т-хелперные эпитопы TBI-tag не подвергали изменениям, поскольку они формируют α -спиральный каркас белка. Размер полученного белка составляет 160 а.о., рассчитанная изоэлектрическая точка = 5,97.

Модифицированный вариант белка был назван nTBI. Блок-схема белка nTBI изображена на рисунке 4, а его аминокислотная последовательность и предсказанная вторичная структура представлены на рисунке 6. Ген nTBI также был клонирован в плазмиде pET21a в рамке считывания с последовательностью, кодирующей 6 а.о. гистидина. Карта полученной плазмиды представлена на рисунке 7.

С использованием сконструированных плазмид pET_TBI_tag и pET-nTBI были получены штаммы-продуценты *E. coli* соответствующих белков. На рисунке 8 представлена электрофореграмма лизатов клеток-продуцентов рекомбинантных белков TBI_tag и nTBI.

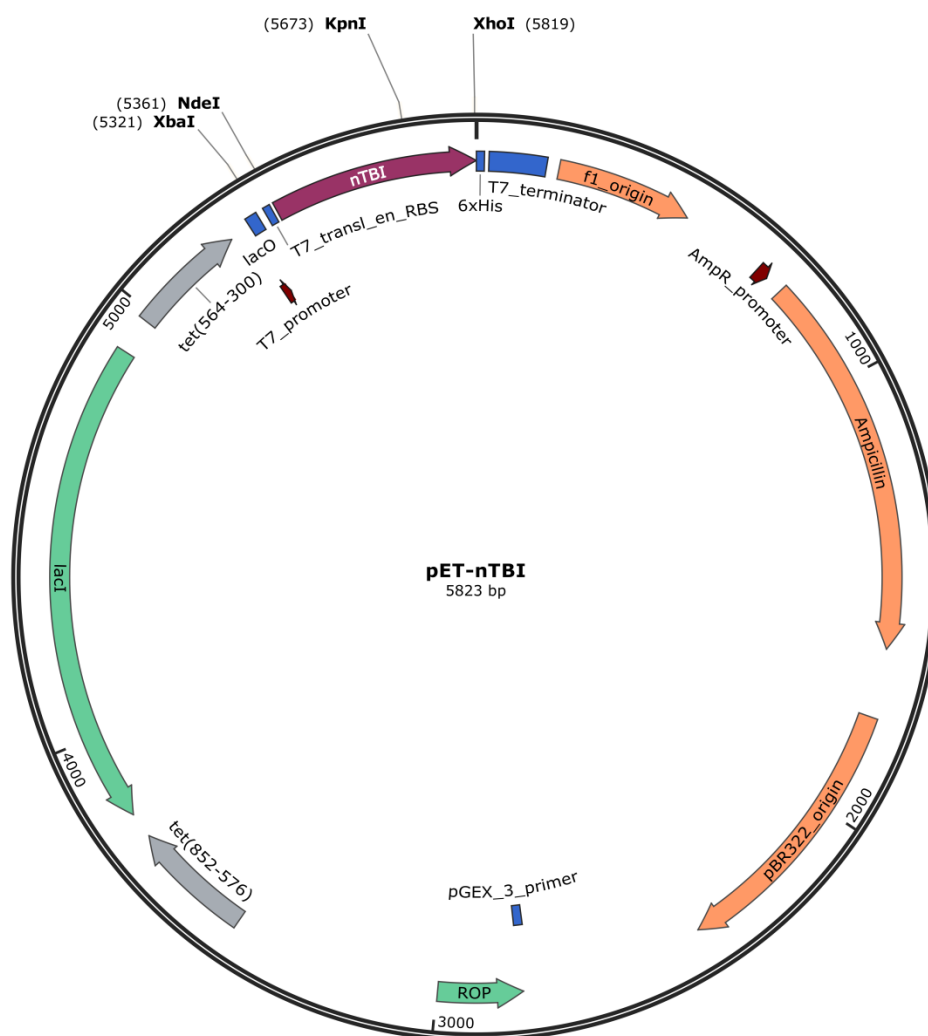


Рисунок 7. Карта плазмиды pET-nTBI

В ходе процедуры очистки было установлено, что рекомбинантные белки TBI_tag и nTBI находятся в тельцах включения, поэтому была использована схема очистки, включающая разрушение клеток *E. coli* ультразвуком, экстракцию белков из телец включения раствором мочевины, аффинную хроматографию с использованием Ni-NTA-агарозы и рефолдинг белков с помощью диализа. Степень очистки белков TBI_tag и nTBI оценивали с помощью электрофореза в 15 % ПААГ. В конечном препарате степень очистки белка составляла более 90 % (рисунок 8). Было обнаружено, что nTBI обладает аномально высокой подвижностью в ПААГ (сдвиг около 2 кДа) относительно расчетного значения (или относительно TBI_tag). Возможно, это связано с более высоким

содержанием гидрофобных а.о. в nTBI, в частности включением 8 а.о. триптофана.

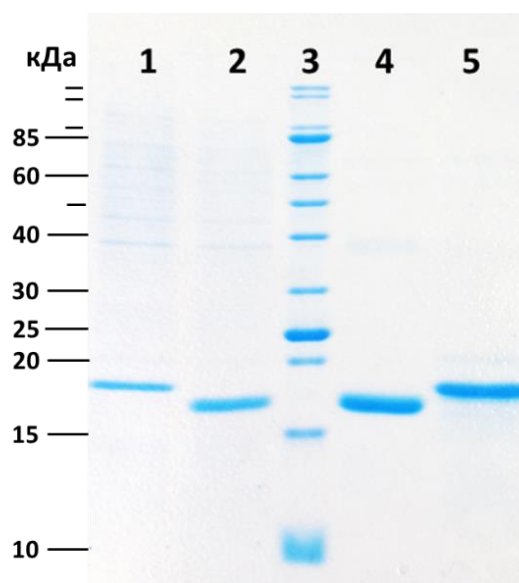


Рисунок 8. Электрофореграмма белков TBI_tag и nTBI в 15 % ПААГ. 1 – лизат клеток *E. coli* BL21(DE3) pLysS / pET-TBI_tag после индукции ИПТГ; 2 – лизат клеток *E. coli* BL21 (DE3) pLysS / pET-nTBI после индукции ИПТГ; 3 – маркер молекулярной массы M31 (СибЭнзим, Россия); 4 – белок nTBI после очистки; 5 – белок TBI_tag после очистки

Экспериментальное определение вторичной структуры белков TBI_tag и nTBI проводили с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД). С помощью этого метода можно определить доли α -спиралей, β -тяжей и неструктурированных областей в структуре белка. Результаты измерения спектров КД TBI_tag и nTBI (рисунок 9) приведены в таблице 1. Спектры были зарегистрированы в разных условиях (вода, физиологический раствор, 20 % раствор трифторэтанола).

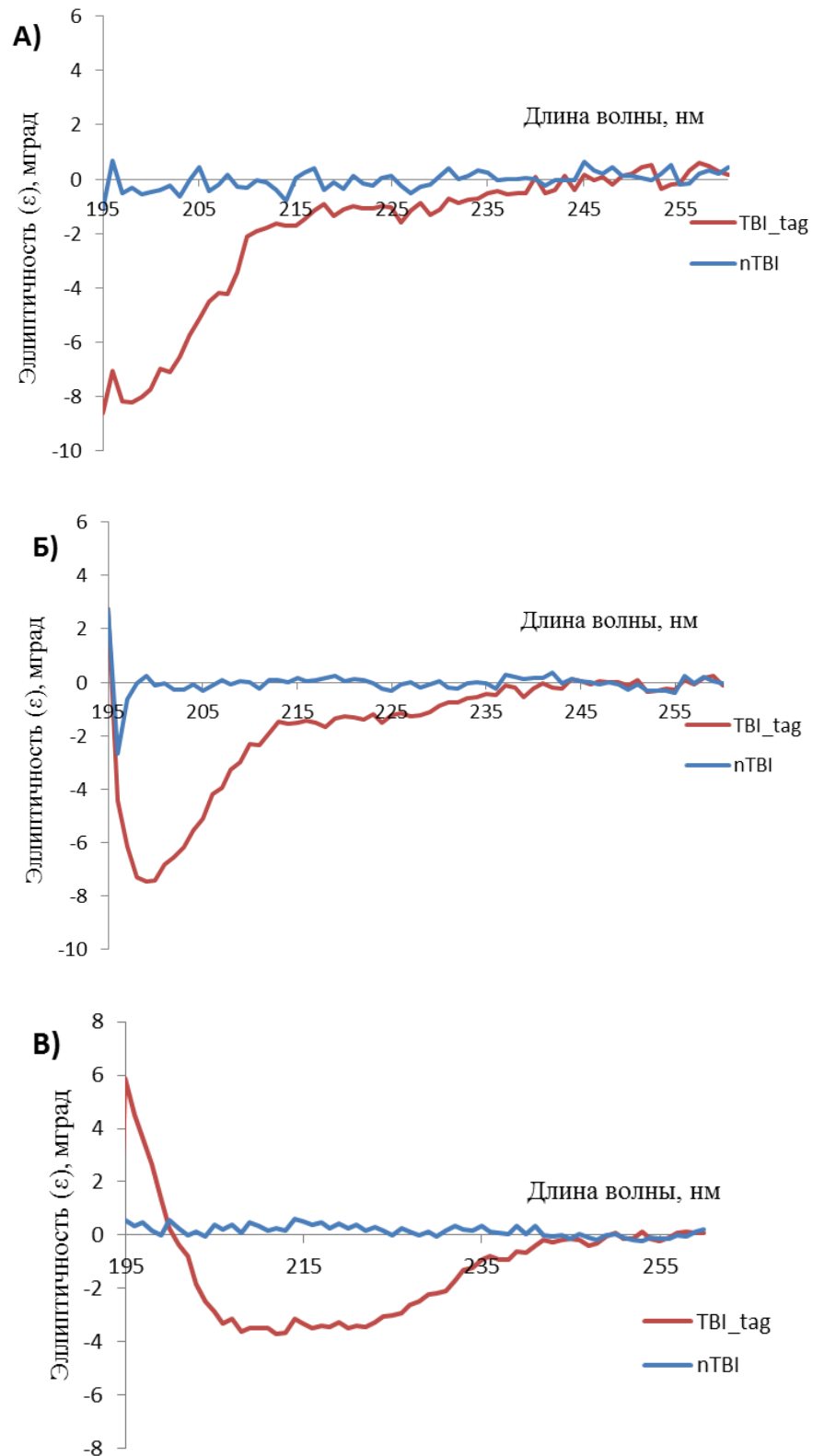


Рисунок 9. Спектры кругового дихроизма белков TBI_tag и nTBI. А – спектры КД в воде; Б – спектры КД в физиологическом растворе; В – спектры КД в 20 % растворе трифторэтанола

Результаты кругового дихроизма

Структура	Образец		
	TBI_tag		
	Физиологический раствор	20 % трифторэтанол	Вода
α -спирали	13 %	54 %	14 %
β -тяжи	14 %	4 %	11 %
Поворот_I	2 %	4 %	2 %
Поворот_II	0 %	0 %	0 %
Неупорядоченные структуры	70 %	37 %	72 %

По полученным данным можно сделать вывод, что структура белка TBI_tag подвижна в физиологических условиях. При добавлении трифторэтанола, который стабилизирует альфа-спиральные участки, наблюдается значительное увеличение доли α -спиральной структуры.

Амплитуда КД-сигнала для белка nTBI во всех исследованных буферных условиях была близка к нулю и сопоставима с уровнем шума. Это не позволяет идентифицировать вторичную структуру данного белка в исследуемых условиях. Полученные данные могут говорить о том, что структура белка nTBI очень вариативна.

Для доказательства того, что окрашенные Кумасси полосы соответствуют целевым белкам, проводили вестерн-блот анализ с использованием мышинового моноклонального антитела 29F2, которое распознает пептид из белка p24 ВИЧ-1 (EPFRDYVDRFYKTLR). Этот пептид входит в состав как nTBI, так и TBI-tag. Было показано, что оба белка связываются с 29F2 (рисунок 10). Для анализа антигенных свойств эпитопов, узнаваемых широконейтрализующими антителами в составе nTBI, был проведен вестерн-блот анализ и дот-блот анализ с

использованием МКА 10E8, 4E10, 2F5 и VRC01. Было установлено, что линейные В-клеточные эпитопы, включенные в состав nTBI, распознаются соответствующими МКА (4E10, 2F5 и 10E8), за исключением имитатора эпитопа, узнаваемого антителом VRC01 (рисунок 10, 11).

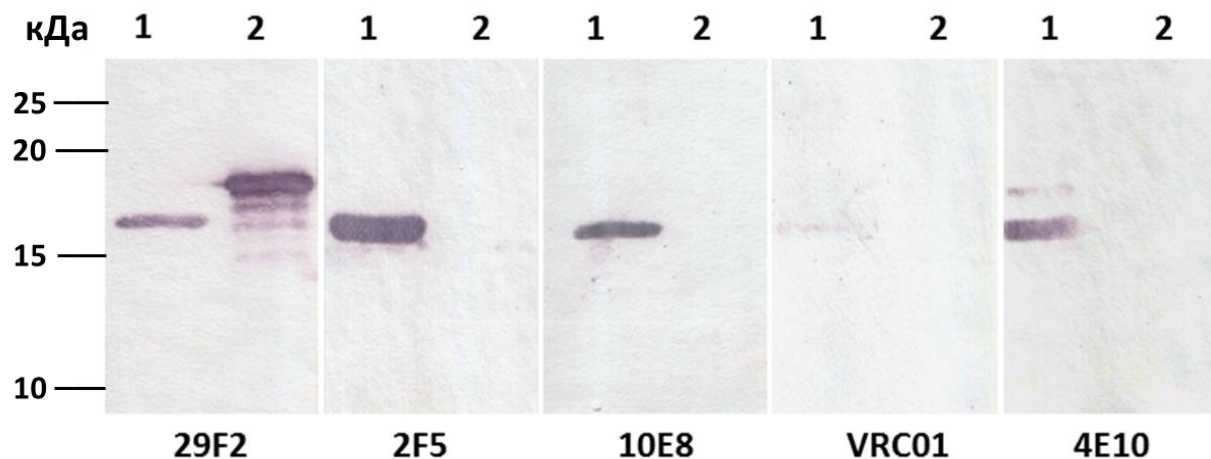


Рисунок 10. Вестерн-блот-анализ белков TBI_tag и nTBI. 1 – сорбирован белок nTBI; 2 – сорбирован белок TBI_tag; 29F2, 2F5, 10E8, VRC01 и 4E10 – моноклональные антитела, используемые в анализе

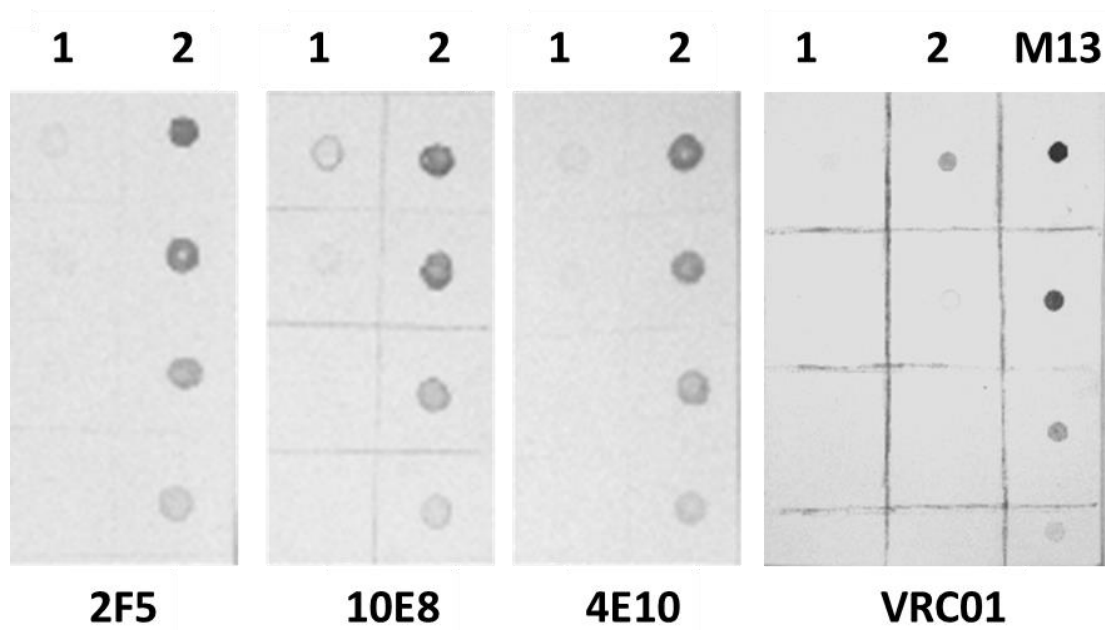


Рисунок 11. Дот-блот белков TBI_tag и nTBI. 1 – сорбирован белок TBI_tag; 2 – сорбирован белок nTBI; M13 – (бактериофаг, несущий в составе белка р3 пептида-имитатора VRC01); 2F5, 10E8, 4E10 и VRC01 – моноклональные антитела, используемые в анализе. Сверху вниз нанесены двукратные разведения соответствующих белков

Итак, в случае с МКА VRC01 было показано, что оно значительно хуже взаимодействует с пептидом имитатором в составе nTBI, чем с тем же пептидом в составе белка р3 бактериофага M13 (Chikaev и др., 2015). Неэффективное связывание VRC01 с пептидом-имитатором, находящимся в составе nTBI, может быть связано с изменением его конформации или его экранированием отдельными а.о. белка-носителя.

Для анализа иммуногенности модифицированных белков была проведена иммунизация кроликов очищенными препаратами. Кролики были трехкратно иммунизированы очищенными белками TBI_tag и nTBI. Иммунизация проводилась с интервалом 2 недели, забор образцов крови для анализа проводили через две недели после последней иммунизации.

Полученные сыворотки были проанализированы с помощью ИФА с использованием в качестве антигенов рекомбинантных белков TBI_tag и nTBI. В качестве контроля использовались сыворотки крови, взятой у кроликов до иммунизации. Было установлено, что в сыворотках крови обеих групп животных содержатся антитела, специфичные к исследуемым иммуногенам. Средние титры антител в сыворотках кроликов, иммунизированных как TBI_tag, так и nTBI, достигали 1:3 000 000 после третьей иммунизации. Между кроликами в группах существенной разницы в титре сывороток не наблюдалось (рисунок 12).

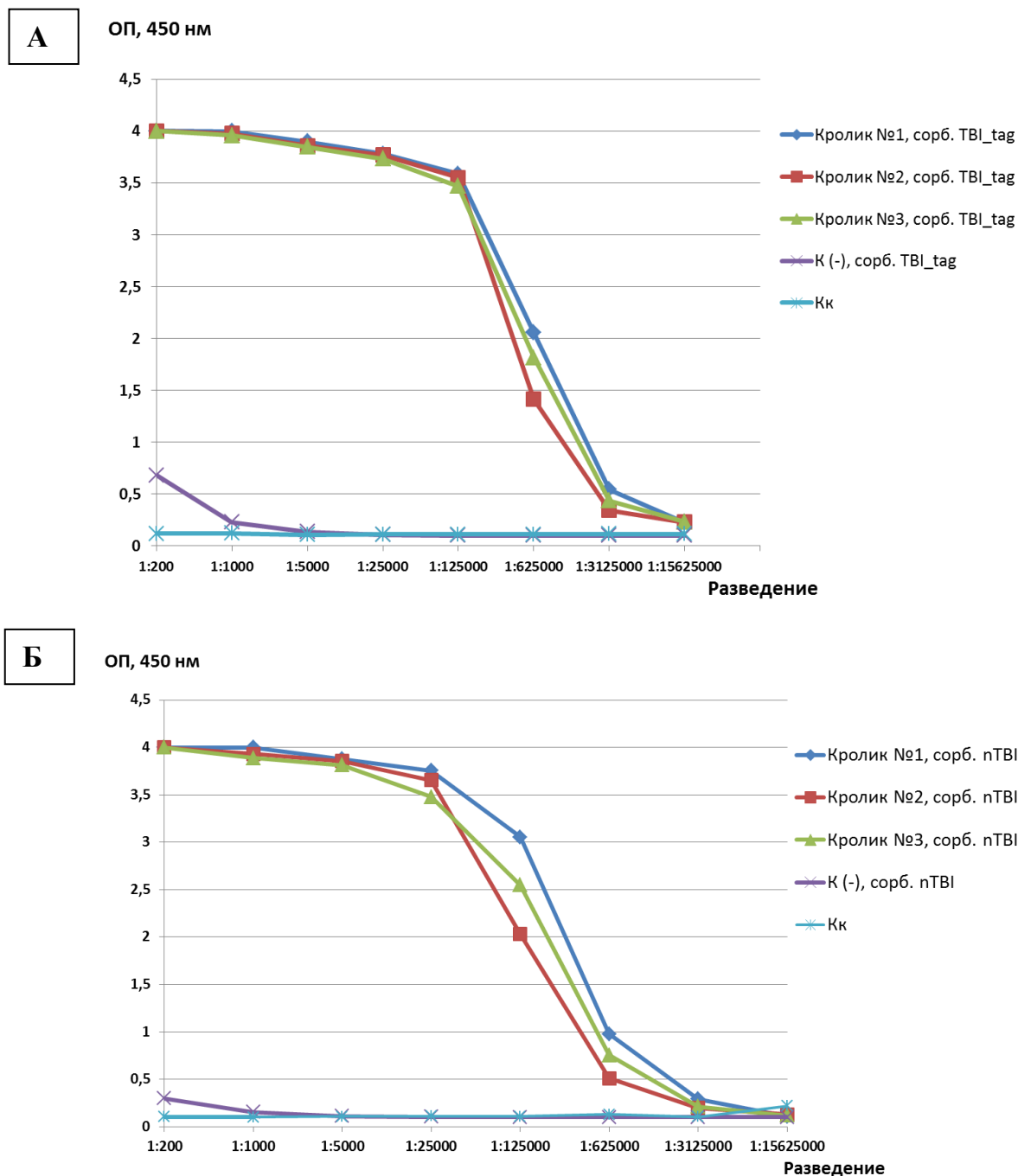


Рисунок 12. Результаты ИФА сывороток лабораторных животных, иммунизированных TBI-tag и nTBI. В качестве антигена сорбирован рекомбинантный белок TBI_tag (А) или nTBI (Б) в концентрации 5 мкг/мл. На вертикальной оси отложены значения ОП450, на горизонтальной оси отложены разведения сывороток

Образцы сывороток дополнительно анализировали с помощью иммуноблоттинга на наличие специфических антител к белкам ВИЧ-1 (рисунок 13). Для этого была использована коммерческая тест-система New Lav Blot 1. В качестве отрицательного контроля использовались преиммунные

сыворотки, в качестве положительного контроля – сыворотка ВИЧ-инфицированного пациента из набора New Lav Blot 1. Было установлено, что сыворотки, полученные от кроликов, иммунизированных nTBI, содержат антитела против белков gp120, gp160, gp41 и p24 (p55) ВИЧ-1, тогда как антитела, индуцированные иммунизацией кроликов TBI_tag, дополнительно способны распознавать белок p17 ВИЧ-1 (рисунок 13). Эти результаты подтверждают структуру иммуногенов, поскольку nTBI не несет эпитоп из p17 ВИЧ-1, который был заменен эпитопом антитела 2F5.

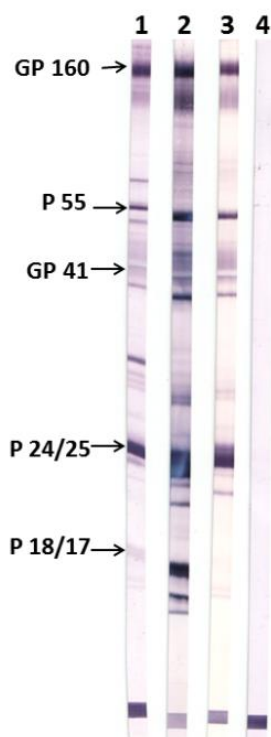


Рисунок 13. Анализ сывороток крови животных, иммунизированных белками TBI_tag и nTBI, с использованием коммерческой тест-системы New Lav blot 1. 1 – положительный контроль из набора New Lav Blot; 2 – объединенные сыворотки кроликов, иммунизированных TBI_tag; 3 – объединенные сыворотки кроликов, иммунизированных nTBI; 4 – пул преиммунных сывороток кроликов из обеих групп

Для анализа вируснейтрализующей активности антител из сывороток иммунизированных животных были выделены фракции IgG, которые исследовали в реакции вируснейтрализации с использованием Env-псевдовирuses ВИЧ-1. В реакции вируснейтрализации использовались Env-псевдовирuses ВИЧ-1, входящие в состав референсной панели (NIH, США). На первом этапе проводили

анализ с использованием легко нейтрализуемого псевдовируса SF162.LS (уровень 1a, субтип В). Было показано, что IgG из сывороток крови кроликов, иммунизированных TBI_tag и nTBI, эффективно нейтрализуют этот псевдотипированный штамм ВИЧ-1, тогда как IgG из преиммунных сывороток не проявляют нейтрализующей активности (рисунок 14). При этом нужно отметить, что IgG против nTBI более эффективно нейтрализовали ВИЧ-псевдовирус, чем IgG против исходного TBI_tag. IC₅₀ анти-nTBI IgG составляла 0,22 мкг/мл, что в 6 раз ниже, чем IC₅₀ для анти-TBI_tag IgG, которая составляла 1,38 мкг/мл (рисунок 14).

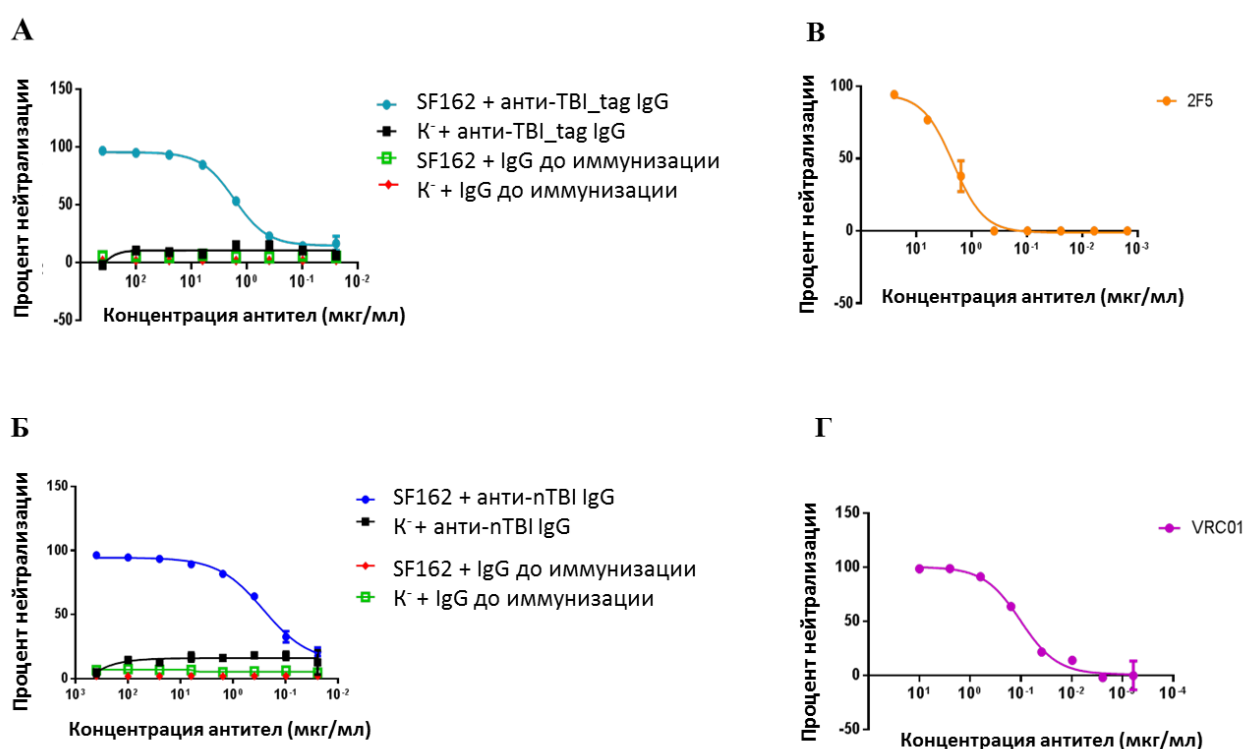


Рисунок 14. Нейтрализующая активность IgG, выделенных из сывороток крови животных, иммунизированных белками TBI_tag и nTBI, в отношении псевдовируса SF162.LS. Кривые нейтрализации: (А) анти-TBI_tag IgG; (Б) анти-nTBI IgG; (В) МКА 2F5 и (Г) VRC01 (положительный контроль). Вирусные частицы, псевдотипированные гликопротеином оболочки вируса Марбурга, использовали в качестве отрицательного контроля

Затем была определена нейтрализующая активность очищенных иммуноглобулинов по отношению к env-псевдовирусам ВИЧ-1 второго и третьего уровней устойчивости (таблица 2). Было установлено, что TBI_tag и nTBI индуцируют наработку антител с умеренной нейтрализующей активностью

против штамма QH0692 (второй уровень устойчивости). Средние значения IC_{50} в отношении данного псевдовируса составили 2,63 мкг/мл для антител, индуцированных иммунизацией nTBI, и 4,46 мкг/мл для антител, индуцированных иммунизацией TBI_tags (таблица 2). IC_{50} для МКА 2F5 составило 3,7 мкг/мл, для VRC01 0,1 мкг/мл в отношении QH0692, что согласуется с литературными данными (Webb и др., 2015).

Нейтрализующая активность IgG nTBI и IgG TBI_tag в отношении Env-псевдовирuсов ВИЧ-1

Псевдовирус	Суб тип	Корецеп тор	Уров ень	*IgGs TBI_tag		*IgGs nTBI		МКА 4Е10
				Процент нейтрализ ации (%)	* IC ₅₀ (мкг/мл)	Процент нейтрали зации (%)	IC ₅₀ (мкг/мл)	IC ₅₀ (мкг/мл)
SF162.LS	B	R5	1a	96±1,00	1,38 ± 0,95	96 ± 0,06	0,22 ± 0,13	0,56 ± 0,12
QH0692	B	R5	2	54,64±0,09	4,46 ± 2,82	67,31 ± 0,03	2,63 ± 0,17	0,77 ± 0,38
6535, clone 3	B	R5	1b	41,00±0,10	>50	48,49 ± 0,14	>50	1,99 ± 0,15
TRO.11	B	R5	2	18,11±4,07	>50	20,7 ± 6,00	>50	1,04 ± 0,69
PV04	B	R5	3	18,93±10,38	>50	34,74 ± 2,53	>50	7,19 ± 0,58

* IgGs TBI_tag и IgGs nTBI – иммуноглобулины, очищенные из сывороток кроликов, иммунизированных TBI_tag и nTBI соответственно. В качестве отрицательного контроля использовался пул IgGs, очищенных из преиммунных сывороток кроликов (IgGs-preimmune). В тесте нейтрализации IgGs-preimmune не проявляли нейтрализующей активности против любого из этих псевдовирuсов (данные не представлены). Образцы тестировали в трех повторах, эксперимент повторяли дважды. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

В отношении других псевдовирусов уровня устойчивости 2 и 3 (tier 2 и tier 3), уровень нейтрализующей активности как анти-TBI_tag IgG, так и анти-nTBI IgG был ниже 50 %.

Однако, стоит отметить, что процент нейтрализации антител против nTBI был выше, по сравнению с антителами против TBI_tag в отношении тестируемых псевдовирусов (таблица 2).

Также для оценки вируснейтрализующей активности антител проводили реакцию вируснейтрализации с использованием молекулярного клона ВИЧ-1 92BR025 (субтип C, уровень 1b), который входит в международную панель рекомбинантных ВИЧ-1, для анализа нейтрализующей активности антител.

Сравнение нейтрализующей активности IgG из сывороток животных, иммунизированных TBI_tag и nTBI, показало, что оба иммуногена индуцируют наработку антител, нейтрализующих штамм 92BR025 (рисунок 15 А, 15 Б). При этом было установлено, что уровень вируснейтрализующей активности IgG, индуцированных nTBI, был выше, чем IgG, индуцированных TBI_tag. Величина IC_{50} , при которой наблюдалась 50 % нейтрализация вируса, для антител, индуцированных иммунизацией nTBI IgG, составляла 1380 мкг/мл, для антител, индуцированных иммунизацией TBI_tag, – 2630 мкг/мл. IC_{50} для МКА 4E10, которое было использовано в качестве положительного контроля, составило 0,72 мкг/мл, что соответствует литературным данным (Webb и др., 2015).

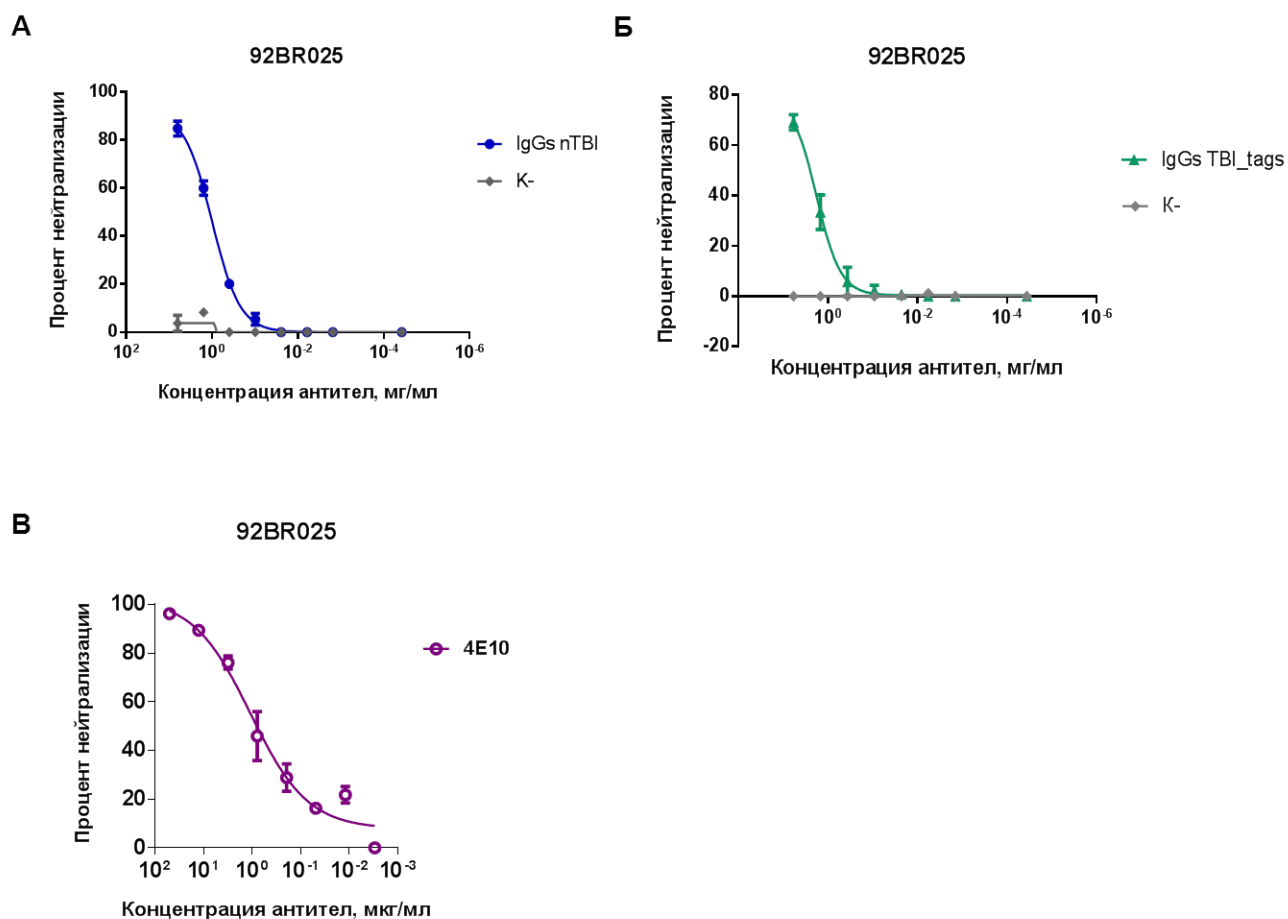


Рисунок 15. Нейтрализующая активность IgG, выделенных из сывороток животных, иммунизированных nTBI и TBI_tag, в отношении молекулярного клона ВИЧ-1 92BR025. Кривые нейтрализации: (А) – анти-nTBI IgGs; (Б) – анти-TBI_tag IgGs; (В) – МКА 4E10 (положительный контроль). В качестве отрицательного контроля (K-) использовались IgGs, выделенные из преиммунных сывороток животных

Для оценки иммунного ответа на встроенные в молекулу nTBI линейные эпитопы из MPER ВИЧ-1 (10E8, 2F5) и линейный пептид-имитатор антитела VRC01, а также их вклада в индукцию нейтрализующих антител, был проведен конкурентный анализ. Для этого оценивали способность синтезированных пептидов 10E8 [NWFNITNWLWYIK], 2F5 [NEQELLELDKWASLWNK] и VRC01 [VSWPELYKWTWS] ингибировать нейтрализацию псевдовируса SF162.LS антителами против TBI_tag и против nTBI.

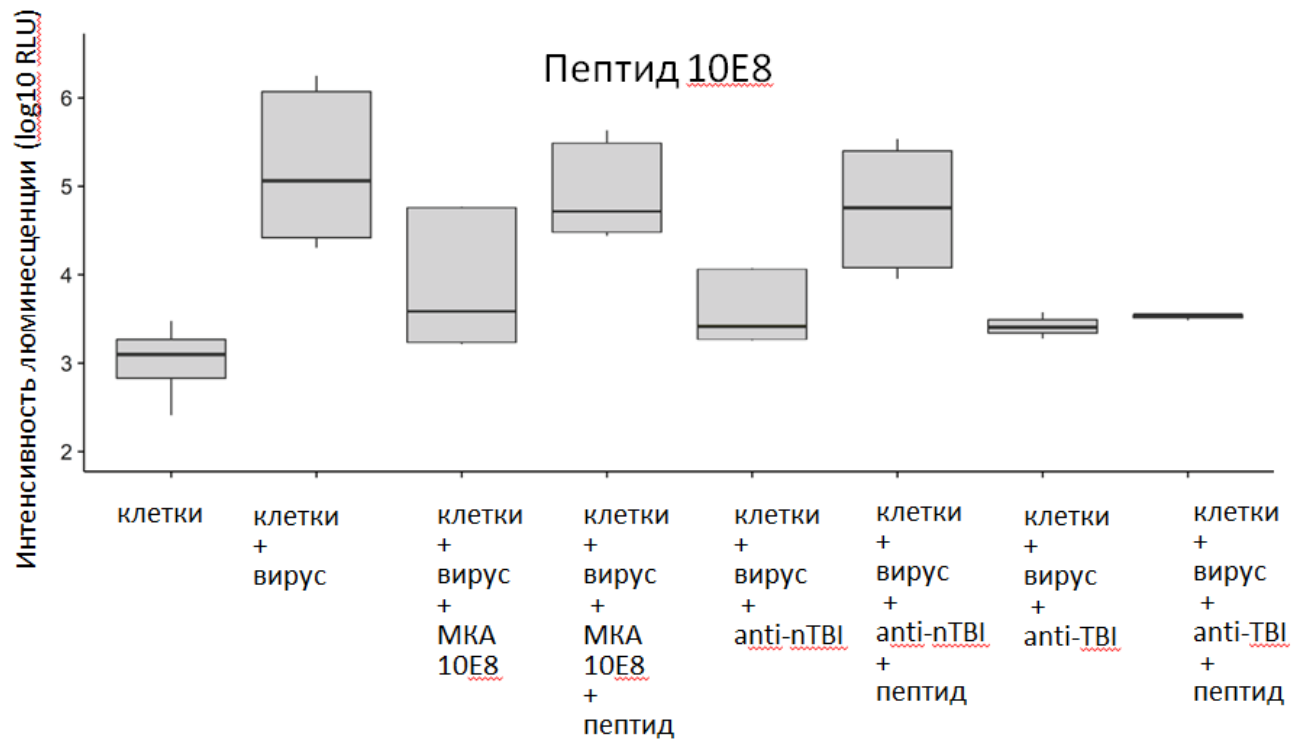
В экспериментах пептид 10E8 показал наиболее интенсивное и воспроизводимое ингибирование нейтрализации псевдовируса SF162.LS антителами против nTBI ($p = 0,000154$) (рисунок 16 А), при этом ингибирование

нейтрализации анти-TBI_tag данным пептидом не происходит (рисунок 16 А). Как и ожидалось, пептид 10E8 блокирует нейтрализацию МКА 10E8 ($p = 0,00231$) (рисунок 16 А). Эти результаты могут свидетельствовать о наличии во фракции IgG, выделенных из сывороток крови животных, иммунизированных nTBI, антител специфичных к пептиду 10E8.

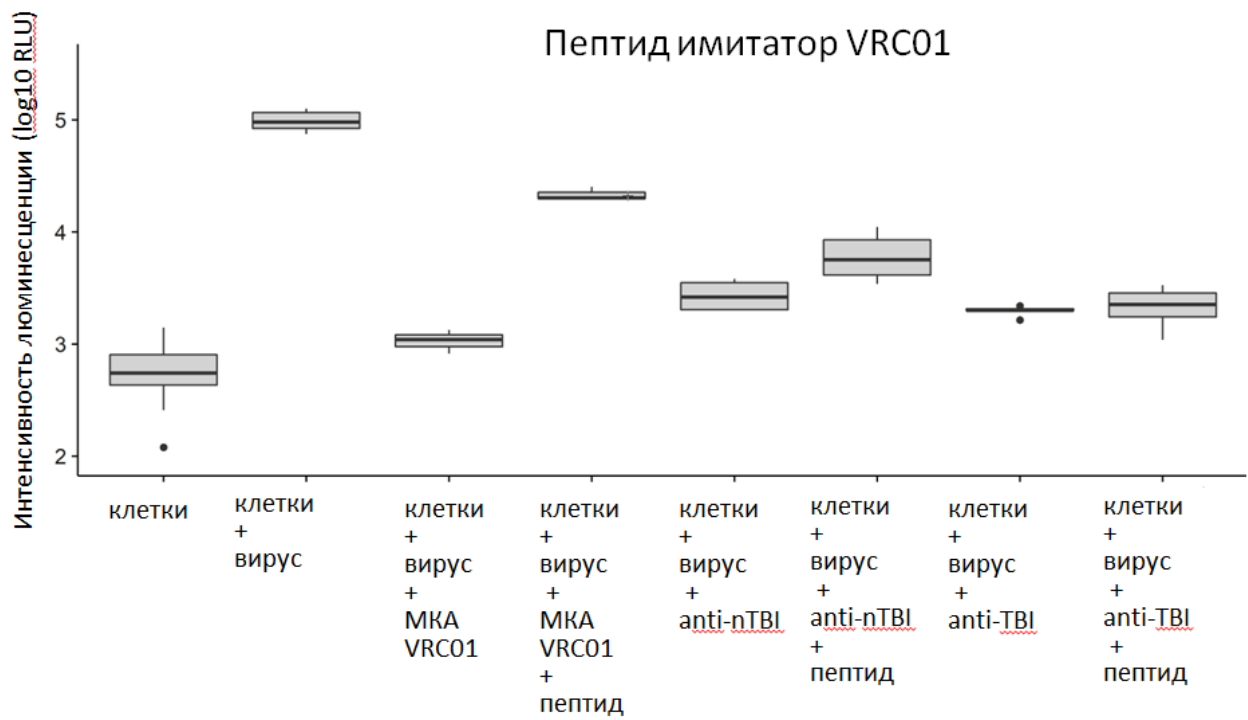
Пептид-имитатор VRC01 вносит скромный вклад в индукцию нейтрализующих антител. При иммунизации белком nTBI на данный мимитоп образуются антитела VRC01, нейтрализующая активность которых уменьшается при добавлении пептида, однако это значение достоверно не отличается от контроля ($p = 0.219$) (рисунок 16 Б). Вероятно, это связано с экранированием пептида-имитатора фланкирующими аминокислотными последовательностями в составе nTBI (что подтверждает выше представленные данные вестерн-блот и дот-блот анализа). Важно отметить, что пептид-имитатор эпитопа VRC01 эффективно ингибировал связывание bNAbs VRC01 с псевдовиром SF162, что согласуется с полученными ранее результатами (Chikaev и др., 2015).

В случае пептида 2F5 не удалось показать ингибирование нейтрализации SF162 антителами из сыворотки кроликов, иммунизированных TBI_tags и nTBI, но было показано, что соответствующий пептид ингибирует нейтрализацию МКА 2F5 (рисунок 16 В). Возможно, эпипептиду 2F5 для проявления его иммуногенных свойств критически важно его природное окружение (Ofek и др., 2010).

А



Б



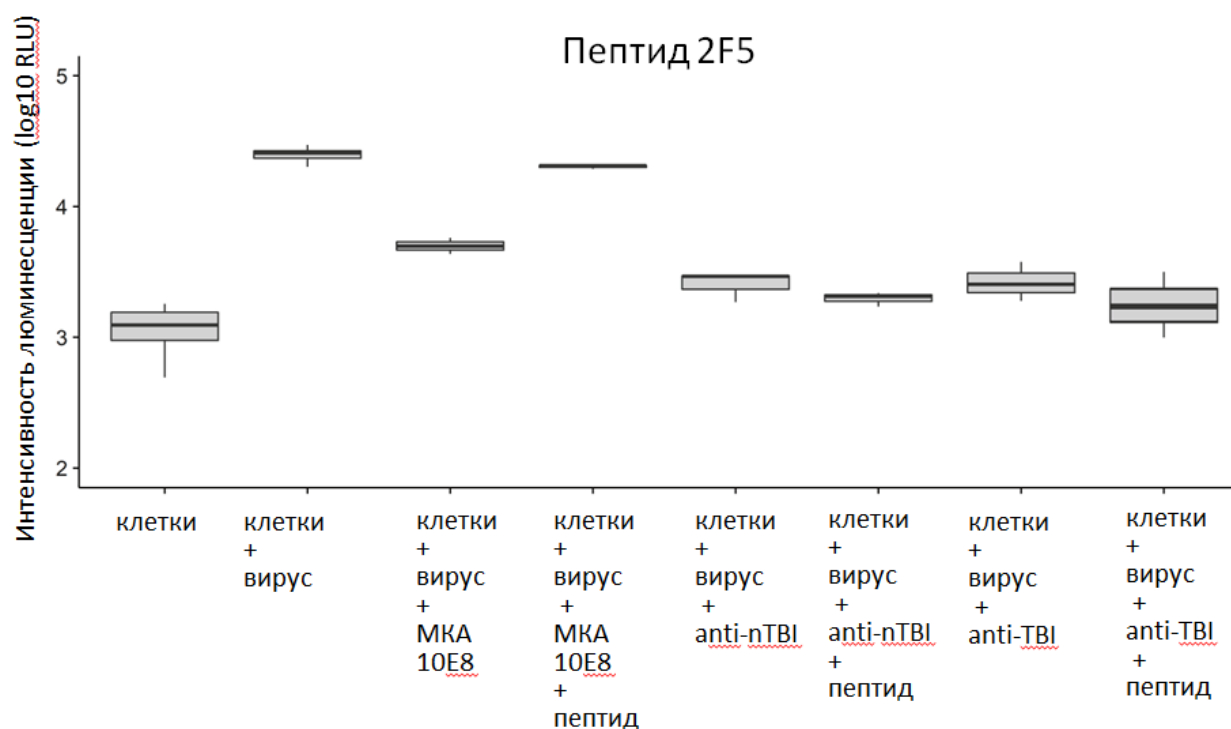
В

Рисунок 16. Ингибирование вируснейтрализующей активности антител синтетическими пептидами (А) 10E8; (Б) VRC01 и (В) 2F5. Реакцию вируснейтрализации проводили с использованием клеток TZM-bl и псевдовируса SF162, к которым добавляли смесь: пептид и МКА, или пептид и анти-nTBI IgG, или пептид и анти-TBI_tag IgG. Соответствующие обозначения указаны по оси абсцисс. По оси ординат отложена интенсивность люминесценции (log₁₀ RLU)

Таким образом, в результате проделанной работы был сконструирован белок nTBI, содержащий эпитопы, узнаваемые широконейтрализующими антителами 10E8, 4E10, 2F5, и линейный имитатор конформационного эпитопа, узнаваемого МКА VRC01. С помощью спектроскопии КД установлено, что TBI_tag имеет преимущественно альфа-спиральную структуру, для nTBI о вторичной структуре говорить затруднительно, поскольку не удалось зарегистрировать спектры КД в исследуемых условиях. С помощью иммуноблотинга установлено, что линейные эпитопы, узнаваемые МКА 10E8, 4E10, 2F5, за исключением пептида-имитатора VRC01, сохраняют свои антигенные свойства в составе рекомбинантного белка nTBI. Мимотоп VRC01, находясь в составе nTBI, не узнавался МКА VRC01, вероятно, из-за его экранирования фланкирующими а.о. Этот факт необходимо учитывать в работах

по созданию ВИЧ-иммуногенов в будущем. Несмотря на то, что пТВИ не формирует выраженную вторичную структуру, это не мешает ему проявлять свою биологическую активность как иммуногена. Мы показали, что пТВИ индуцирует антитела, обладающие более высоким уровнем вируснейтрализующей активности по сравнению с антителами к исходному варианту TBI_tag.

3.2 Иммуноген против ВИЧ-1 на основе белка HBsAg, экспонирующий линейный пептид-имитатор, узнаваемый bNAb VRC01

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. Возможным решением проблемы является использование линейных пептидов-имитаторов конформационных антигенных детерминант ВИЧ-1, отобранных методами комбинаторной биологии, например, с использованием техники фагового дисплея (Karpenko и др., 2012; Shcherbakova и др., 2016), и их включение в подходящий белок-носитель.

Как было показано выше, МКА VRC01 значительно хуже взаимодействует с пептидом-имитатором в составе пТВИ, чем с тем же пептидом в составе белка р3 бактериофага М13. Неэффективное связывание VRC01 с пептидом-имитатором, находящимся в составе пТВИ, может быть связано с изменением его конформации или его экранированием после смены аминокислотного окружения пептида, отличного от белка р3 бактериофага М13. В связи с этим было решено использовать другой белок-носитель, а именно – HBsAg, который является одной из перспективных систем презентации чужеродных эпитопов (Pumpens и Grens, 2016). HBsAg состоит в среднем из 200 идентичных белковых субъединиц размером 21 кДа, которые обладают способностью самоорганизовываться в коровую частицу (рисунок 17). В данной работе HBsAg был использован в качестве носителя пептида-имитатора эпитопа, узнаваемого МКА VRC01, полученного с помощью фагового дисплея.

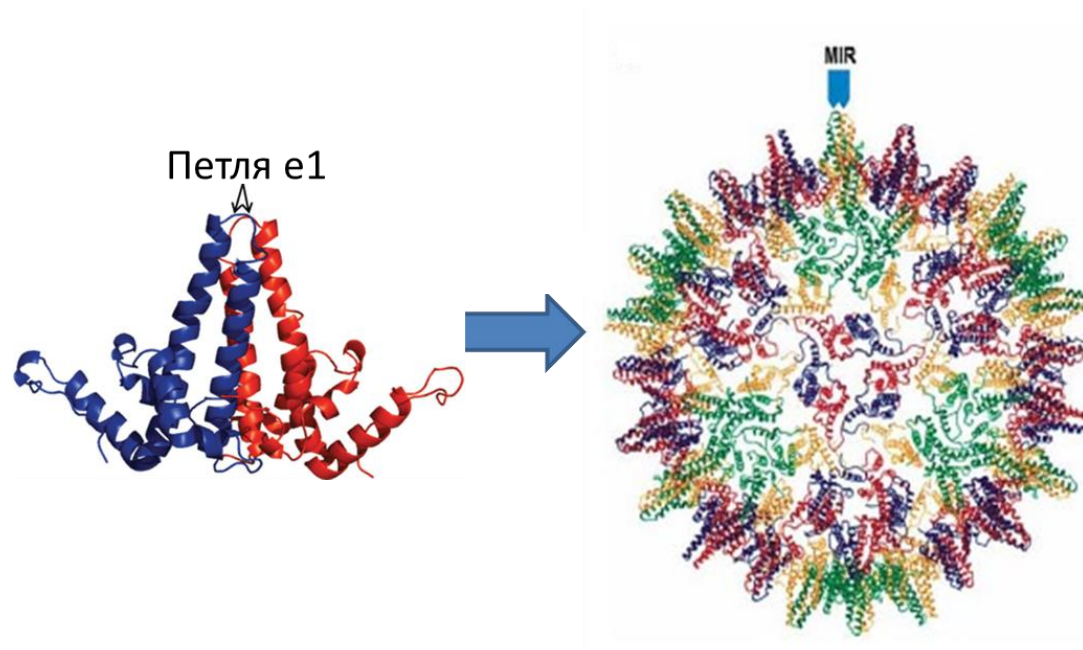


Рисунок 17. Модель частицы HBsAg (Pumpens и Grens, 2016)

Ранее в лаборатории была получена плазмида на основе вектора pUC8, несущая ген HBsAg (Веремейко и др., 2007). Встройку олигонуклеотидного дуплекса, кодирующего пептид-имитатор антитела VRC01, проводили в область, соответствующую 81 а.о. HBsAg (район главной антигенной детерминанты кора – e1) (рисунок 18). В результате была получена рекомбинантная плазмида pUC-HBsAg-mimicVRC01, кодирующая химерный белок HBsAg-mimicVRC01.

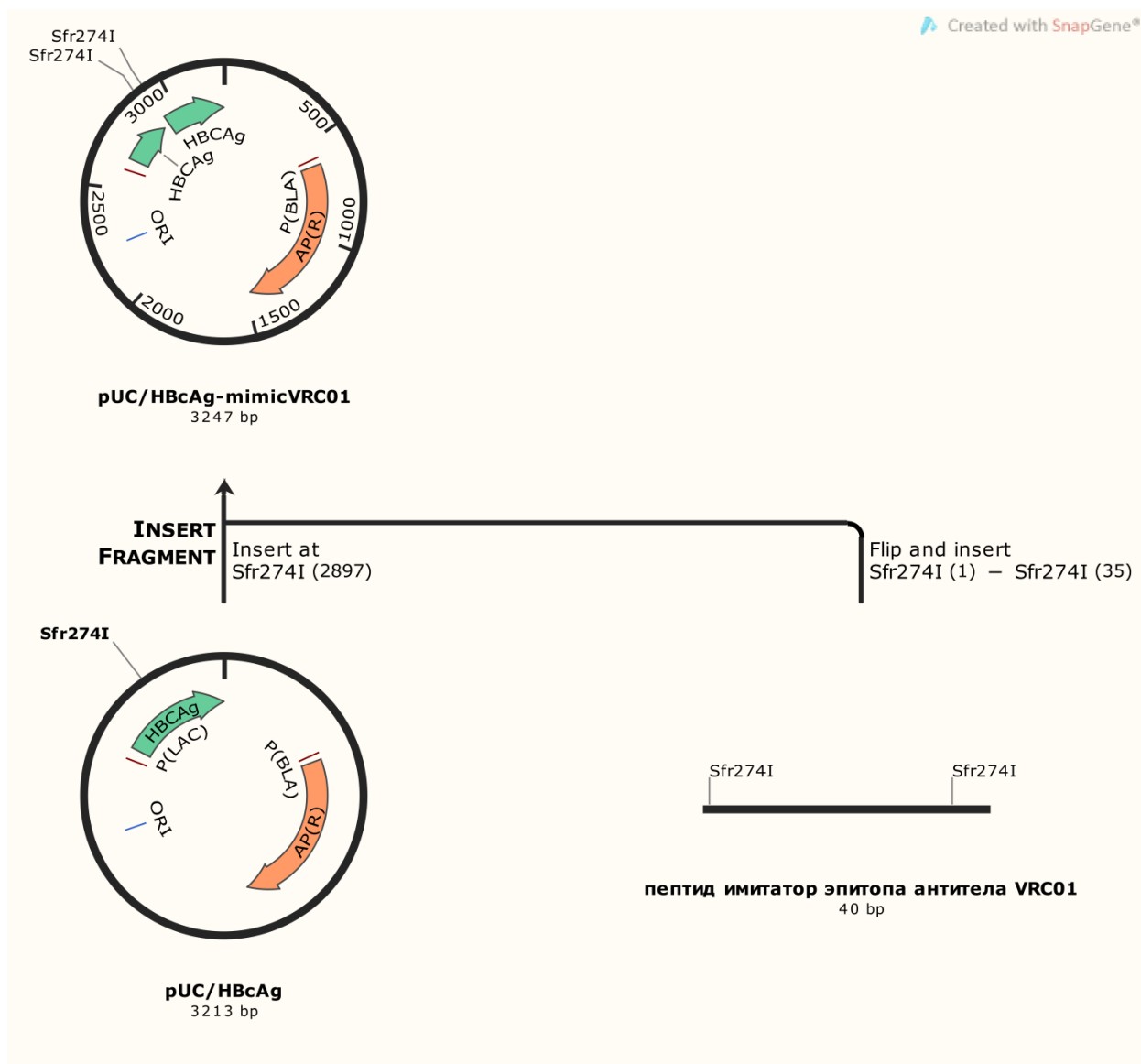


Рисунок 18. Схема клонирования олигонуклеотидного дуплекса, кодирующего имитатор эпитопа, узнаваемого МКА VRC01, в составе плазмиды pUC-HBcAg

Было показано, что в клетках *E. coli* JM103, трансформированных pUC-HBcAg-mimicVRC01, синтезируется белок, по электрофоретической подвижности соответствующий теоретически рассчитанной (рисунок 19 А). Детекцию рекомбинантного белка HBcAg-mimicVRC01 в клетках *E. coli* проводили с помощью вестерн-блот-анализа с использованием МКА к HBcAg. В качестве контроля использовали нативный HBcAg. Было установлено, что МКА одинаково эффективно узнают как исходный HBcAg, так и HBcAg-mimicVRC01 (рисунок 19 Б). Для анализа антигенных свойств пептида-имитатора эпитопа антитела VRC01 в составе HBcAg был проведен дот-блот-анализ с использованием МКА VRC01.

Было установлено, что имитатор в составе HBcAg распознается МКА VRC01 (рисунок 19 В).

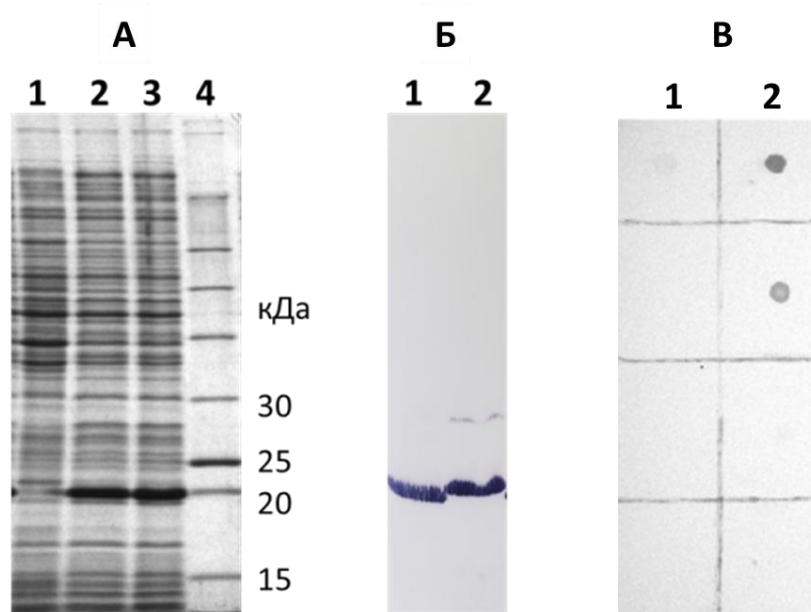


Рисунок 19. Электрофоретический и иммунохимический анализ белков HBcAg и HBcAg-mimicVRC01. (А) 1 – лизат культура *E. coli* JM103 без плазмиды; 2 – лизат клеток *E. coli* JM103/pUC/HBcAg-mimicVRC01; 3 – лизат клеток *E. coli* JM103/pUC/HBcAg, 4 – маркер молекулярной массы М31 (СибЭнзим, Новосибирск); (Б) вестерн-блот анализ с моноклональным антителом к HBcAg 1 – *E. coli* JM103/pUC/HBcAg, 2 – *E. coli* JM103/pUC/HBcAg-mimicVRC01; (В) дот-блот анализ взаимодействия рекомбинантных белков с МКА VRC01: 1 – HBcAg, 2 – HBcAg-mimicVRC01. Сверху вниз нанесены двух кратные разведения белков HBcAg и HBcAg-mimicVRC01 соответственно

При препаративной наработке рекомбинантного белка HBcAg-mimicVRC01 оказалось, что он 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-6В (предел эксклюзии 106 Да). Было определено, что белки HBcAg и HBcAg-mimicVRC01 при гель-фильтрации выходят из колонки в свободном объеме. Это позволяет предположить, что исследуемые белки формируют частицы.

Для подтверждения того, что белки HBcAg и HBcAg-mimicVRC01 действительно образуют вирусоподобные частицы, был проведен анализ с помощью электронной микроскопии. Было установлено, что рекомбинантный

HBsAg формирует характерные частицы, при этом химерный HBsAg-mimicVRC01 склонен к кластеризации частиц. Возможным объяснением данного явления может быть гидрофобность двух а.о. лейцина встраиваемого пептида CSWTLLGYC, за счет чего частицы стремятся к объединению между собой (рисунок 20).

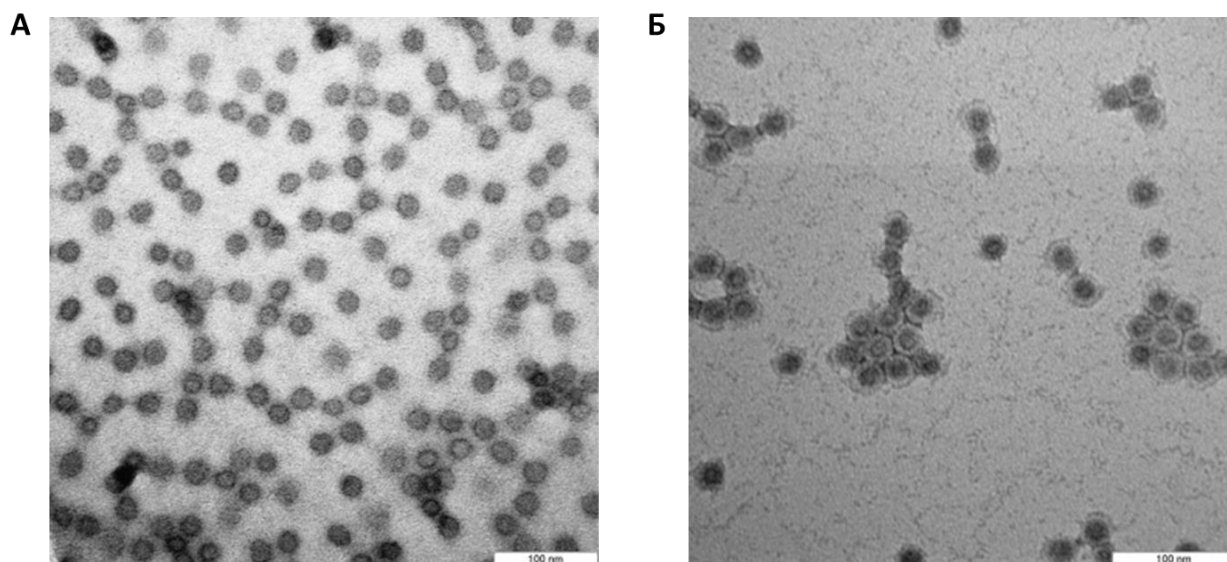


Рисунок 20. Электронная микрофотография частиц HBsAg. (А) и химерных частиц HBsAg-mimicVRC01; (Б) электронные микрофотографии выполнены Б. Н. Зайцевым, О. С. Тарановым, отдел микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Для анализа иммуногенности химерного HBsAg, очищенными препаратами белков были иммунизированы две группы мышей линии BALB/c. С помощью иммуноферментного анализа было показано, что в сыворотках иммунизированных животных выявляются специфические антитела к рекомбинантным белкам HBsAg и HBsAg-mimicVRC01. Титр иммунных сывороток в обеих группах был не менее 1:300 000.

Для оценки вируснейтрализующей активности из сывороток крови иммунизированных животных были выделены фракции IgG, которые анализировали путем постановки реакции нейтрализации с использованием молекулярного клона ВИЧ-1 92BR025. Результаты нейтрализующего анализа показали, что IgG из сывороток животных, иммунизированных белком HBsAg-mimicVRC01, обладают способностью нейтрализовать штамм 92BR025. При этом

сыворотки животных из контрольной группы (иммунизированных HBcAg) не проявляют подобной нейтрализующей активности (рисунок 21).

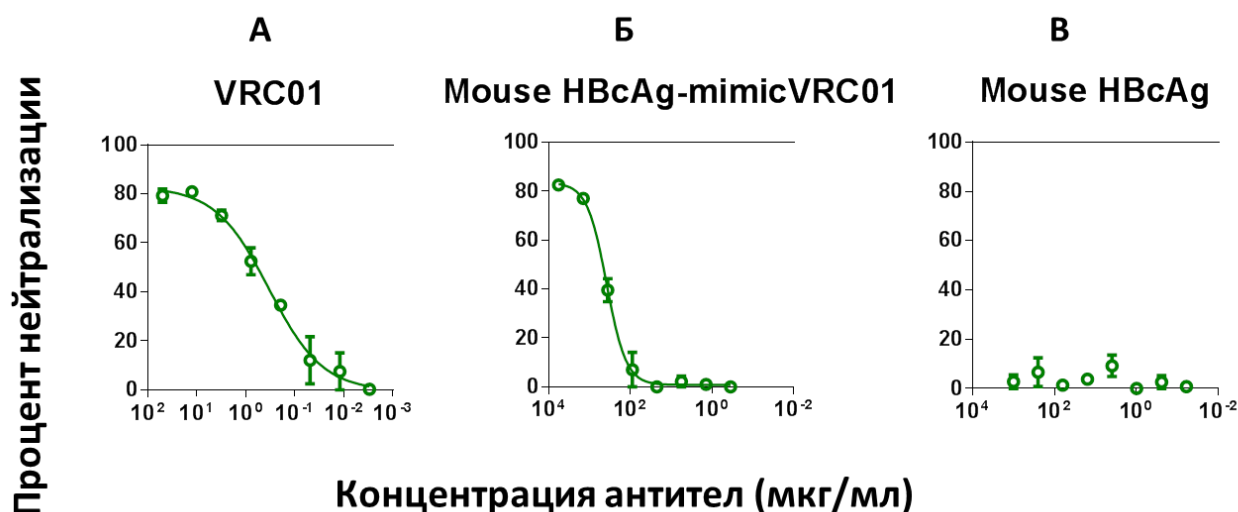


Рисунок 21. Нейтрализующая активность IgGs, выделенных из сывороток иммунизированных животных, в отношении молекулярного клона ВИЧ-1 92BR025. (А) кривые нейтрализации вируса МКА VRC01, ($IC_{50} = 1,58$ мкг/мл), положительный контроль; (Б) кривые нейтрализации вируса IgGs, выделенными из сывороток животных, иммунизированных HBcAg-mimicVRC01 ($IC_{50} = 487$ мкг/мл); (В) кривые нейтрализации вируса IgGs, выделенными из сывороток животных, иммунизированных HBcAg (отрицательный контроль)

Таким образом, была продемонстрирована возможность использования HBcAg в качестве системы презентации имитаторов эпитопов антитела VRC01 и показана иммуногенность имитатора эпитопа МКА VRC01 вне контекста белка бактериофага РIII. Химерный HBcAg-mimicVRC01 может быть использован в стратегиях иммунизации для индукции антител, направленных на регион CD4bs.

3.3 Иммуногены против ВИЧ-1, несущие участки MPER ВИЧ-1 в составе белков TBI и YkuJ

Широконейтрализующие ВИЧ-1 антитела, как правило, нацелены на несколько консервативных регионов, расположенных на поверхности гликопротеина вирусной оболочки (Georgiev и др., 2013; Haynes и др., 2014). Одним из таких регионов является мембрано-проксимальная наружная область (MPER, membrane proximal external region), представляющая собой высококонсервативную область, состоящую из 22 а.о., расположенных на С-конце

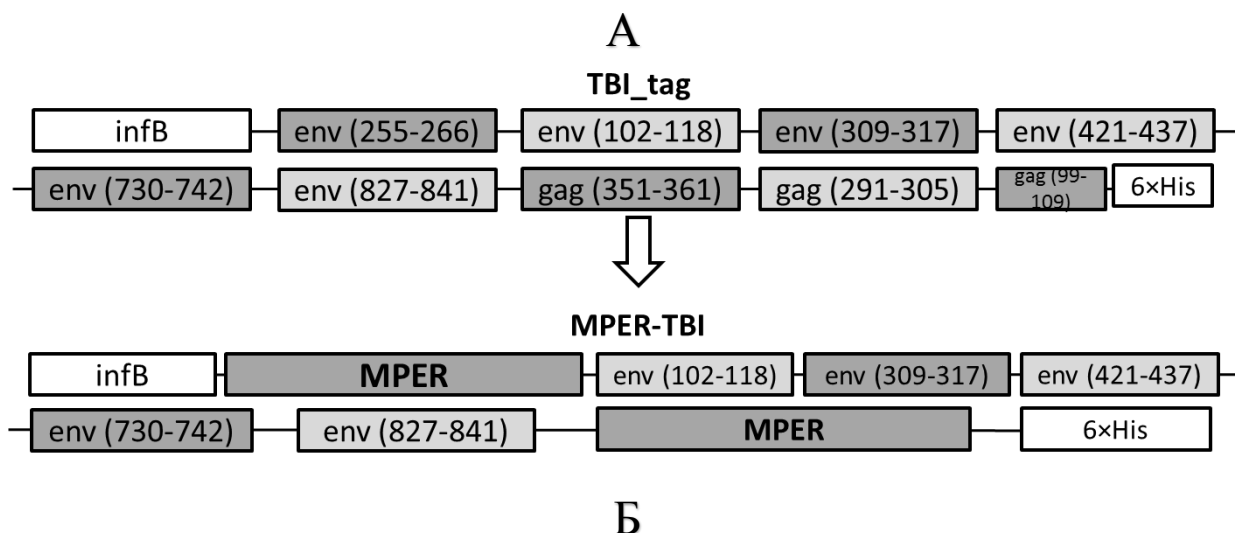
эктодомена gp41. Считается, что MPER играет решающую роль при слиянии вирусной и клеточной мембран (Munoz-Barroso и др., 1999; Salzwedel и др., 1999). На MPER нацелены такие bNAbs, как 2F5, Z13e1, 4E10 и 10E8 (Purtscher и др., 1994; Huang и др., 2012). Среди таких антител наибольший интерес представляют 4E10 и 10E8 из-за их способности нейтрализовать ~ 98 % тестируемых штаммов ВИЧ-1 и отсутствия аутореактивности. Структура эпитопов, узнаваемых данными антителами, была определена с помощью рентгеноструктурного анализа и включает аминокислотные остатки ($_{671}$ NWFDITNWLWYIK $_{683}$) (Cardoso и др., 2007; Huang и др., 2012). Несмотря на то, что эти эпитопы имеют линейную структуру, попытки разработать вакцину, которая смогла бы индуцировать 4E10/10E8-подобные bNAbs, оказались безуспешными (Habte и др., 2015; Banerjee и др., 2016). Одной из причин, осложняющих формирование нейтрализующих антител к MPER является то, что структура субъединицы gp41 является подвижной и претерпевает конформационные изменения при слиянии вирусной и клеточной мембран (Melikyan, 2008).

Таким образом, задачами при разработке вакцины на основе MPER является разработка иммуногенов и разработка стратегий иммунизации, которые бы направили иммунную систему на область MPER и обеспечили наработку нейтрализующих антител к данному региону. Для конструирования иммуногенов, способных презентировать участки MPER региона ВИЧ-1, были выбраны белок TBI и белок YkuJ *Bacillus subtilis*, С- и N-концевые районы которых являются альфа-спиральными – структура, характерная для MPER региона.

3.3.1 Белок MPER-TBI

Полученный белок nTBI (описан в разделе 3.1) содержит 2 эпитопа, из MPER-региона: эпитоп 10E8 на N-конце молекулы и эпитоп 2F5 на С-конце молекулы. Как было показано выше, оба эпитопа сохраняют свои антигенные свойства в составе nTBI и взаимодействуют с соответствующими МКА (10E8 и 2F5). Однако при иммунизации nTBI в сыворотках животных не удалось обнаружить нейтрализующих антител, специфичных к эпитопу 2F5.

В связи с этим было решено увеличить размер встройки на С- и N-концах белка TBI_tag, путем включения двух участков MPER ВИЧ-1 (ELLELDKWASLANWFIITNLLWLIK и IALLLLDAWASLWNWFDITNWLWYI), в состав которых входят эпитопы антител 2F5, 4E10 и 10E8. Спроектированный белок был назван MPER-TBI (156 а.о., 17.8 кДа). Блок-схема и аминокислотная последовательность белка MPER-TBI изображена на рисунке 22.



MTDVTIKGSTHGIELLELDKWASLANWFIITNLLWLIKTMHEDIISLWDQSLKPG
IQRGPGRAFGSKQIINMWQEVGKAMYAPGAPEGIEEEGGERDRGSDRVIEVVQ
GAYRAIRGTEIALLLLDASLWNWFDITNWLWYIGSGLEVENNNNNN

Рисунок 22. (А) Схематическое изображение структуры иммуногенов TBI_tag и MPER-TBI. Темным фоном выделены В-клеточные эпитопы, светлым фоном – Th-эпитопы. InfB – фрагмент белка-активатора транскрипции *E. coli* InfB; 6 × His – шесть аминокислотных остатков гистидина; MPER – участки мембрано-проксимальной наружной области ВИЧ-1; (Б) аминокислотная последовательность белка MPER-TBI

Для того, чтобы оценить, как планируемые встройки двух фрагментов MPER могут повлиять на структуру искусственного белка, было проведено построение пространственной модели белка с использованием программы I-TASSER (I-TASSER, 2018). Программа позволяет на основе аминокислотной последовательности белка с достаточно высокой точностью предсказывать ее пространственную укладку и использует принцип моделирования по гомологии с известными структурами белков. Процесс моделирования MPER-TBI описан в приложении № 2. Предсказанная модель белка представлена на рисунке 23.

Согласно полученной модели, N- и С-концевые участки молекулы являются альфа-спиральными (что соответствует структуре MPER региона), внутренний каркас молекулы представлен чередованием альфа-спиральных участков и петлевых структур (что согласуется со структурой белка TBI).



Рисунок 23. Пространственная модель белка MPER-TBI, полученная с помощью сервиса I-TASSER

Ген, кодирующий белок MPER-TBI, был клонирован в составе плазмидного вектора рЕТ21а в рамке считывания с последовательностью, кодирующей 6 а.о. гистидина. Карта полученной плазмиды представлена на рисунке 24. Структура полученной рекомбинантной плазмиды была подтверждена секвенированием. Получение, очистка и характеристика антигенных и иммуногенных свойств белка MPER-TBI описана в разделе 3.3.2.

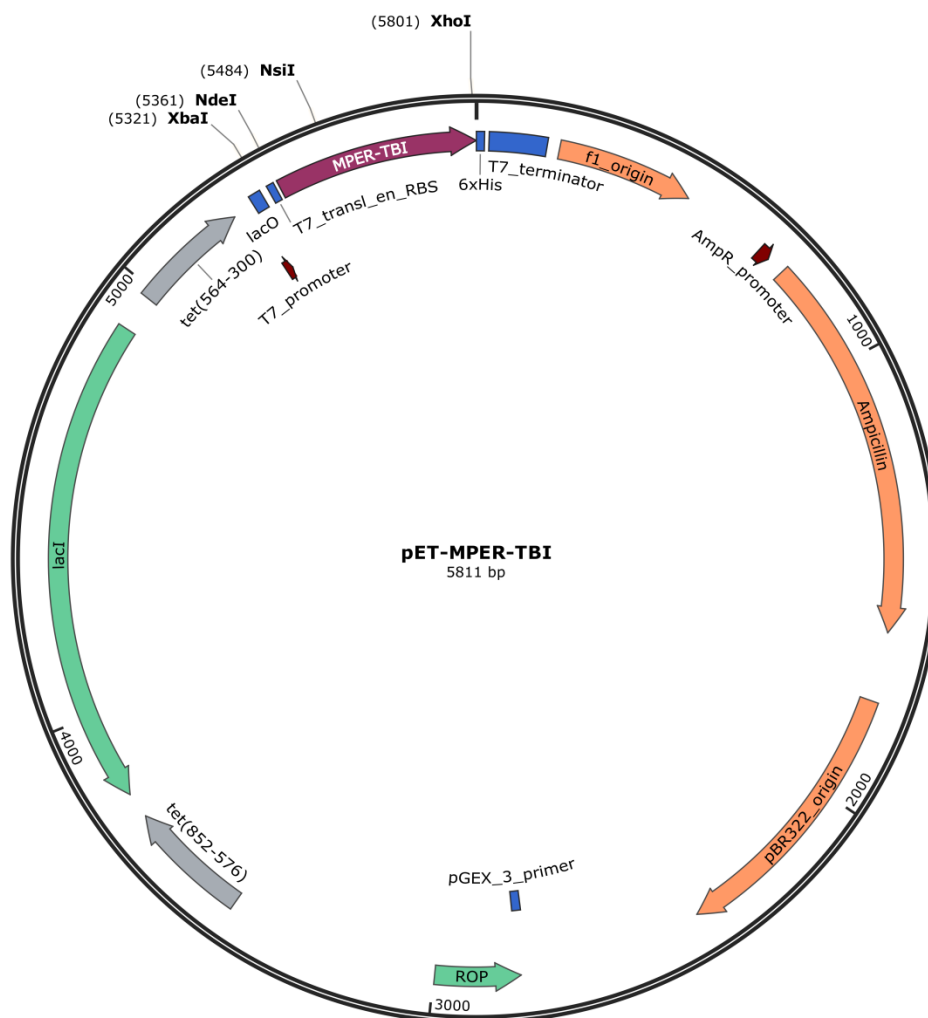


Рисунок 24. Карта плазмиды pET-MPER-TBI

3.3.2 Белок YkuJ-MPER

В данной работе было решено сконструировать молекулу на основе белка-носителя, который бы частично ограничивал конформацию эпитопов, но при этом обеспечивал их подвижность. При конструировании иммуногена были поставлены задачи: включение в молекулу MPER районов с N- и C-конца таким образом, чтобы два антитела одновременно могли связаться с иммуногеном; возможность MPER принимать конформации, характерные для эпитопов известных моноклональных антител: 2F5 и Z13 (конформация без регулярной вторичной структуры), 4E10 и 10E8 (альфа-спиральная конформация). Также было необходимо обеспечить нетоксичность, отсутствие нежелательных аутоиммунных реакций, растворимость и небольшой размер белка носителя.

Так как структура субъединицы gp41 является подвижной, было решено сконструировать молекулу на основе белка-носителя, который бы обеспечивал частичную конформационную подвижность встроенных участков MPER. В результате поиска подходящей структуры с помощью классификатора белковых структур SCOP был найден глобулярный белок *B. subtilis* YkuJ (рисунок 25 А) с известной третичной структурой, определенной рентгеноструктурным анализом, идентификатор PDB 2FFG. Ядро данного белка состоит из антипараллельных β -листов, которые являются жесткой структурой и обеспечивают каркас молекулы. Концевые участки данного белка являются спиральными, что соответствует конформации эпитопов МКА 4Е10 и 10Е8. Свойства этого белка плохо изучены, но известно, что *B. subtilis* не патогенны для человека, что позволяет говорить о его нетоксичности. Общая длина белка YkuJ составляет 78 а.о.

Для определения того, что у человека нет белков, гомологичных YkuJ, использовалась программа BLAST. Значимых совпадений аминокислотной последовательности этого белка с белками человека не было обнаружено, поэтому аутоиммунные реакции маловероятны.

На основе белка YkuJ был спроектирован химерный белок YkuJ-MPER (119 а.о., 14,2 кДа) (рисунок 25 Б). При этом на N- и C-конец были включены участки MPER ВИЧ-1, аналогичные тем, которые были включены в MPER-TBI.

Аминокислотная последовательность YkuJ-MPER представлена ниже:
 MELLELDKWASLANWFIITNLLWLIKTAEEAANPEPMQRYFEVNGEKICSVKYFE
 KNQTFELTVFQAGEKPNTYPFDNIDMVSIEIALLLLDASLWNWFDITNWLW
 YIGSGLENNNNNN.

Методами молекулярного моделирования было установлено, что участки MPER, находясь на концах белка, могут принимать конформацию, характерную для эпитопов известных моноклональных антител: 2F5 и Z13 (конформация без регулярной вторичной структуры), 4Е10 и 10Е8 (α -спиральная конформация). Дополнительно было проведено моделирование с помощью I-TASSER (приложение 3).

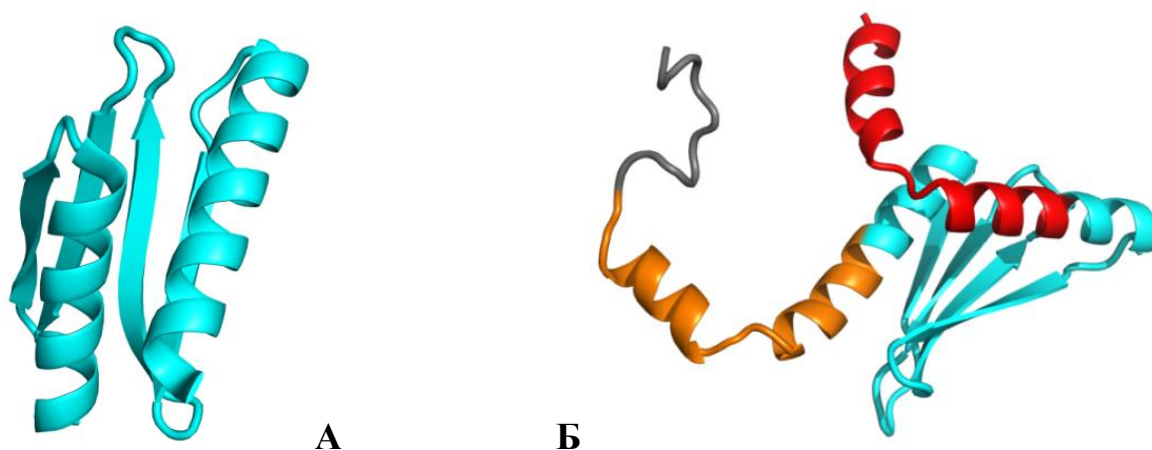


Рисунок 25. (А) структура белка YkuJ; (Б) модель химерного белка YkuJ-MPER. Для наглядности каркас исходного белка выделен бирюзовым, встроенные участки MPER в N-конец – красным, в С-конец – коричневым, гистидиновая метка обозначена серым цветом

Вторичная структура MPER-TBI и YkuJ-MPER, предсказанная с помощью программы PSSfinder представлена на рисунке 26.

Способность белка YkuJ-MPER связываться одновременно с двумя антителами без стерических проблем была подтверждена методами молекулярного моделирования (рисунок 27). Модели белка были построены следующим образом. С помощью программы PyMOL совмещались структуры YkuJ из PDB (2FFG) и структуры фрагментов MPER из комплексов MPER с Fab-фрагментами антител 2F5 (2PR4), 4E10 (2FX8) и 10E8 (4G6F).

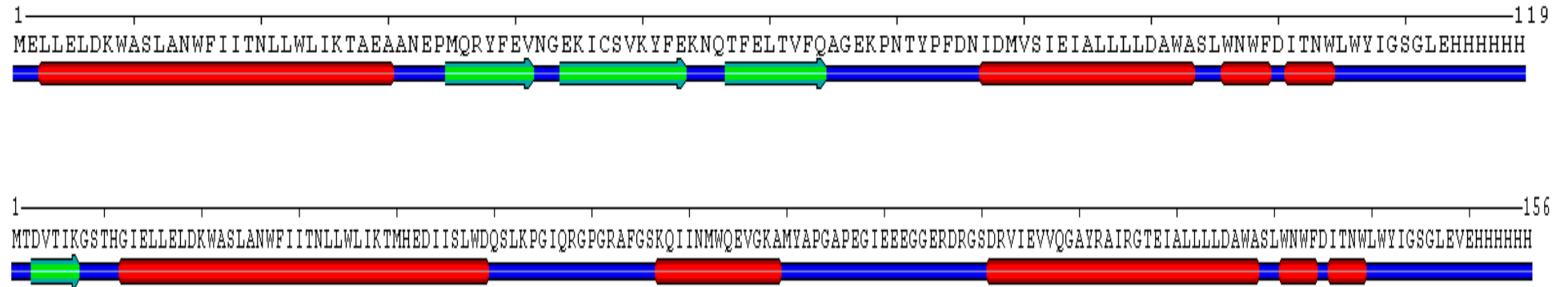


Рисунок 26. Аминокислотная последовательность и вторичная структуры белков YkuJ-MPER (сверху) и MPER-TBI (снизу). Синим цветом обозначены неоформленные структуры, красным обозначены α -спирали, зеленым обозначены – β -листы. Метод предсказания – PSSfinder

Результат такого совмещения использовался как шаблон при моделировании по гомологии в программе Modeller. Затем для проверки возможности соединения YkuJ-MPER с моноклональными антителами на полученные модели с помощью программы PyMOL накладывались соответствующие структуры комплексов MPER с Fab-фрагментами антител. Таким образом, согласно модели, пространственная структура YkuJ позволяет встроить два участка MPER таким образом, что антитела могут связаться одновременно с двумя районами молекулы, не мешая друг другу.

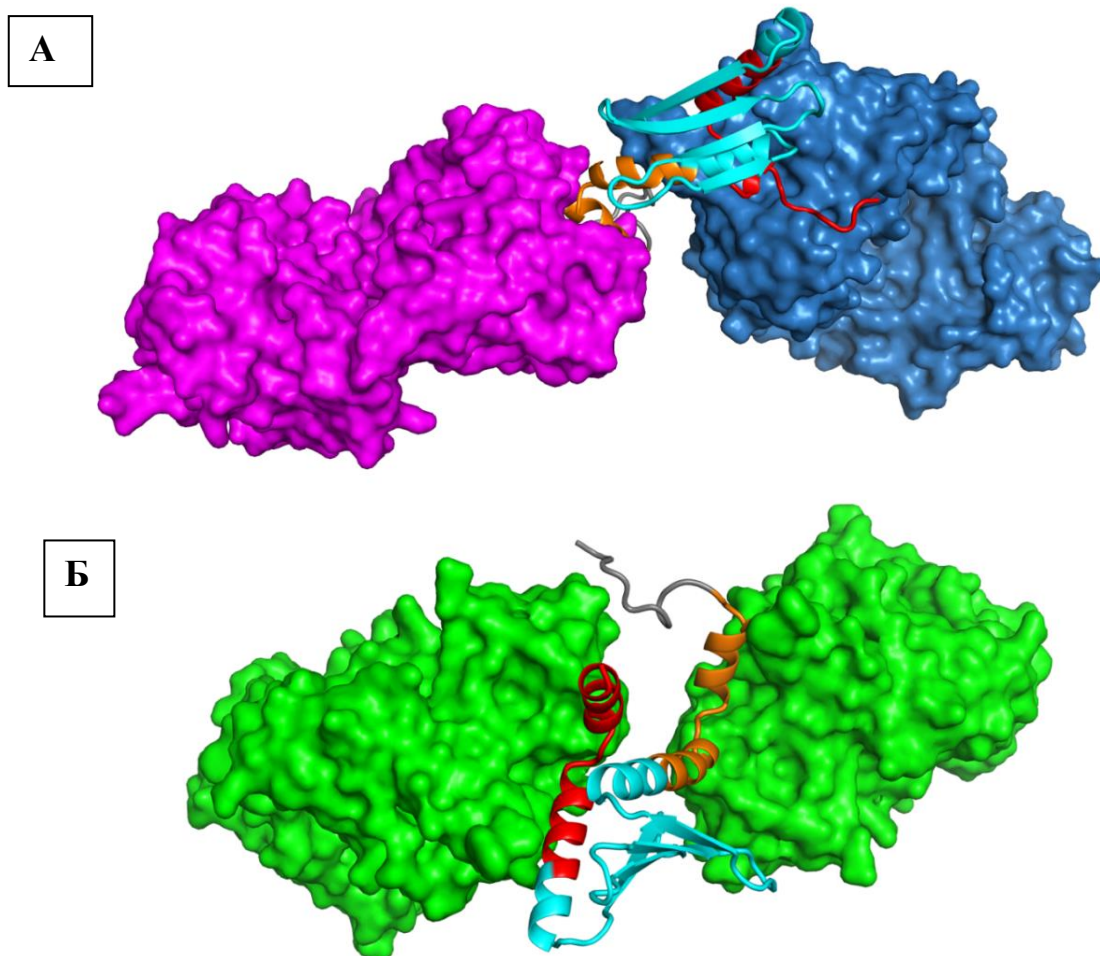


Рисунок 27. Модель взаимодействия YkuJ-MPER с Fab-фрагментами МКА 2F5 и 4E10 (А) и с 10E8 (Б). (А) фиолетовым цветом обозначены Fab-фрагменты антитела 2F5; синим – Fab-фрагменты антитела 4E10; (Б) зеленым цветом обозначены Fab-фрагменты антитела 10E8. Модели построены с помощью программы PyMOL

При проектировании гена YkuJ-MPER в состав нуклеотидной последовательности были заложены уникальные сайты рестрикции, фланкирующие участки MPER, с целью использования данного белка как платформы для получения иммуногенов, содержащих другие антигенные детерминанты. Спроектированный ген YkuJ-MPER был синтезирован. После этого ген химерного белка YkuJ-MPER был клонирован в составе плазмидного вектора pET21a по сайтам рестрикции *Fau*NDI и *Sfr*274I в рамке считывания с последовательностью, кодирующей 6 а.о. гистидина. Карта полученной плазмиды представлена на рисунке 28. Структура полученной рекомбинантной плазмиды была подтверждена секвенированием. Как показало моделирование пространственной структуры белка, фрагмент из 6 а.о. гистидина не препятствует связыванию антител с YkuJ-MPER (рисунок 27).

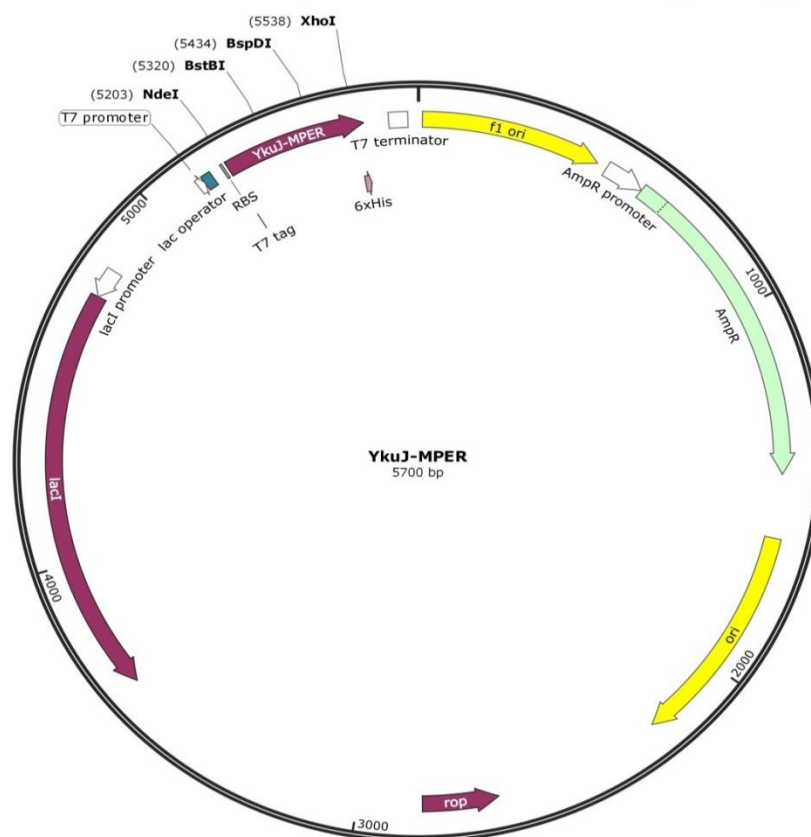


Рисунок 28. Карта плазмиды pET-YkuJ-MPER

Полученными плазмидами pET-YkuJ-MPER и pET-MPER-TBI были трансформированы компетентные клетки *E. coli* BL21 для наработки

рекомбинантных белков. После этого белки YkuJ-MPER и MPER-TBI были очищены с помощью металл-хелатной хроматографии для анализа их структуры, антигенных и иммуногенных свойств. Степень очистки белков оценивали с помощью электрофореза в 15 %-м ПААГ с последующей фиксацией и окрашиванием Кумасси G250 (рисунок 29). Дополнительную очистку белков и их рефолдинг проводили с помощью диализа против буферов со снижающейся концентрацией мочевины.

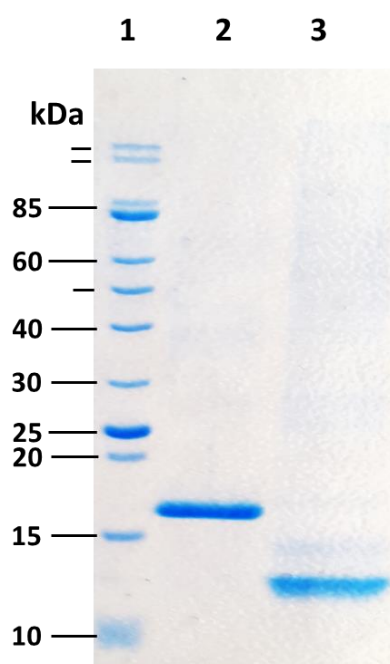


Рисунок 29. Электрофореграмма белков MPER-TBI и YkuJ-MPER: 1 – маркер молекулярной массы; 2 – белок MPER-TBI; 3 – белок YkuJ-MPER

Для исследования антигенных свойств белков YkuJ-MPER и MPER-TBI был проведен дот-блот-анализ с использованием МКА 10E8, 4E10 и 2F5. В качестве контроля использовали TBI_tag, который не содержит эпитопы данных антител. Проведенный анализ подтвердил, что YkuJ-MPER и MPER-TBI узнаются МКА 10E8, 4E10 и 2F5. Было установлено, что при одинаковой концентрации белка МКА эффективнее взаимодействуют с YkuJ-MPER, чем с MPER-TBI (рисунок 30), что может свидетельствовать о более корректной презентации данных эпитопов в составе YkuJ по сравнению с TBI.

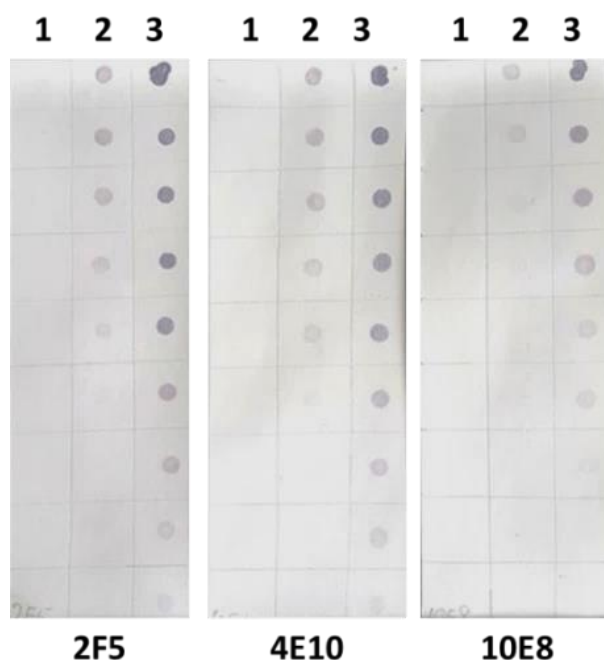


Рисунок 30. Дот-блот-анализ: 1 – сорбирован TBI_tags (контроль); 2 – сорбирован MPER-TBI; 3 – сорбирован YkuJ-MPER; 2F5, 4E10 и 10E8 – МКА. Сверху вниз нанесены двух кратные разведения соответствующих белков

Экспериментальное определение вторичной структуры антигенов YkuJ-MPER и MPER-TBI проводили с помощью спектроскопии кругового дихроизма. Результаты измерения спектров КД (рисунок 31) YkuJ-MPER и MPER-TBI приведены в таблице 3. Полученные данные говорят о том, что структура MPER-TBI является в основном α -спиральной, что согласуется с теоретически предсказанной структурой исследуемого белка.

Модель YkuJ-MPER с N-концевыми районами, соответствующими эпитопам 10E8, имеет следующий состав вторичной структуры: 45 % альфа, 24 % бета. Экспериментальное определение вторичной структуры показывает, что количество β -структуры соответствует модели, а α -спиралей заметно меньше. В сочетании с результатами взаимодействия YkuJ-MPER с МКА это может указывать на то, что MPER-районы в составе YkuJ-MPER могут принимать различную конформацию, тогда как β -лист остается стабильным и обеспечивает каркас иммуногена.

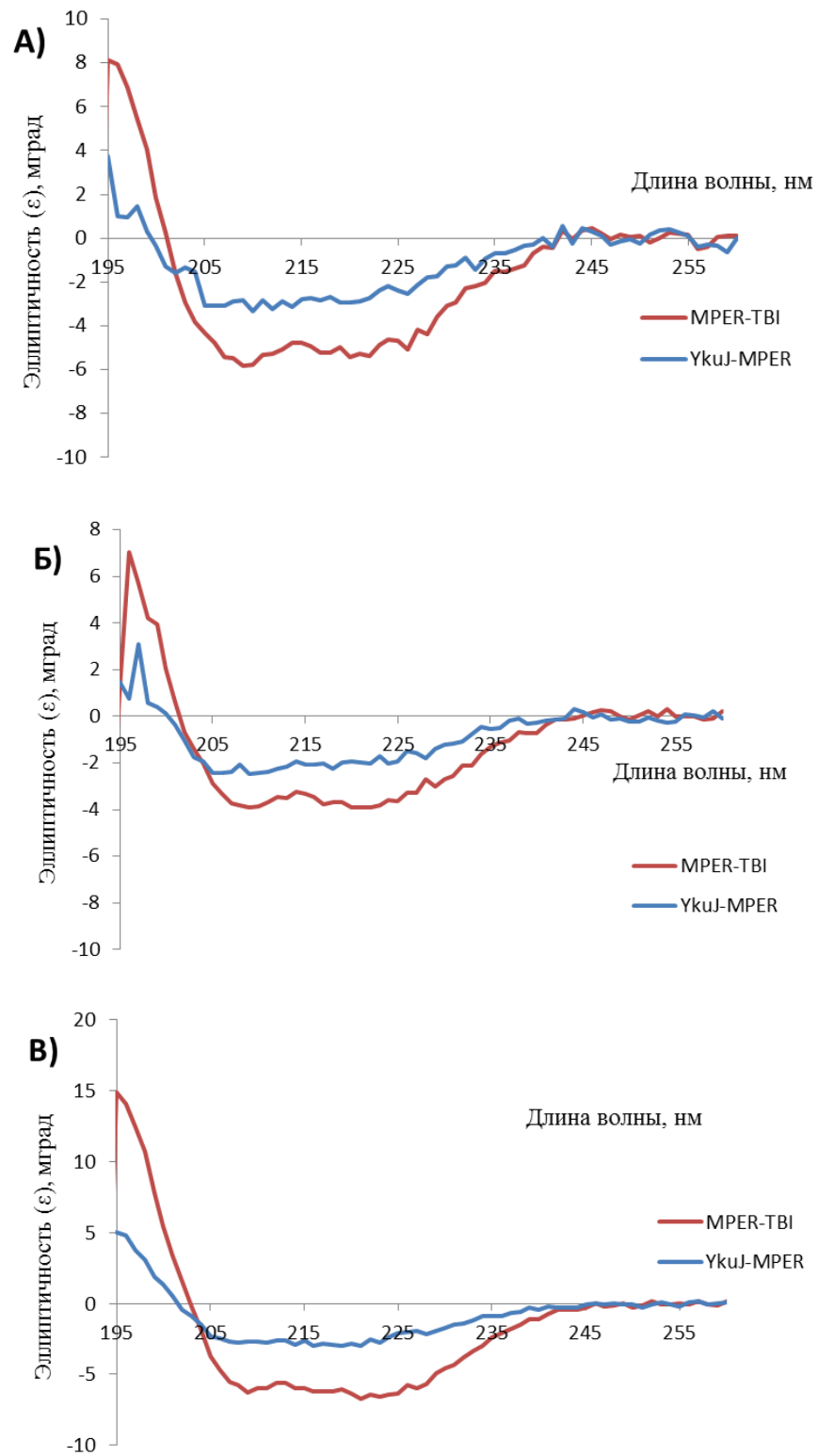


Рисунок 31. Спектры кругового дихроизма белков YkuJ-MPER и MPER-TBI. А – спектры КД в воде; Б – спектры КД в физиологическом растворе; В – спектры КД в 20 % растворе трифторэтанола

Результаты кругового дихроизма

Структура	Образец					
	YkuJ-MPER			MPER-TBI		
	Физиологический раствор	20 % трифторэтанола	Вода	Физиологический раствор	20 % трифторэтанола	вода
α -спирали	26 %	64 %	18 %	68 %	88 %	61 %
β -тяжи	26 %	0 %	36 %	0 %	0 %	3 %
Поворот_I	5 %	6 %	3 %	5 %	4 %	3 %
Поворот_II	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Неупорядоченные структуры	43 %	29 %	44 %	27 %	8 %	34 %

Для анализа иммуногенности белков была проведена иммунизация двух групп кроликов очищенными препаратами YkuJ-MPER и MPER-TBI соответственно. Специфическая активность полученных сывороток была исследована в ИФА. В качестве контроля использовались сыворотки, полученные от кроликов до иммунизации. Было установлено, что в сыворотках крови обеих групп животных содержатся антитела, специфичные к исследуемым иммуногенам. Средние титры антител в сыворотках кроликов, иммунизированных как YkuJ-MPER, так и MPER-TBI, составили 1:1000000 после четвертой иммунизации (рисунок 32 и 33). Сигнал преиммунных сывороток в ИФА был на уровне фона.

Для проверки способности сывороток связываться с «чужим» антигеном, был проведен перекрестный ИФА (анти-MPER-TBI анализировали на способность взаимодействовать с белком YkuJ-MPER, а анти-YkuJ-MPER – с MPER-TBI). Анализ показал, что сыворотки животных перекрестно взаимодействуют с соответствующими антигенами ($p=0,03$).

Было установлено, что при иммунизации MPER-TBI формируются антитела как на MPER регион, так и на другие эпитопы, входящие в состав TBI. Средние титры сывороток крови данной группы на MPER-TBI равны 1:1000000, в случае, когда сорбирован антиген YkuJ-MPER, средние титры равны 1:100000. Средние титры сывороток крови животных, иммунизированных YkuJ-MPER, если в качестве антигена сорбирован YkuJ-MPER равны 1:1000000, в случае, когда в качестве антигена сорбирован MPER-TBI средние титры равны 1:800000 (рисунок 32 и 33). Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что при иммунизации YkuJ-MPER образуются антитела специфичные к MPER ВИЧ-1.

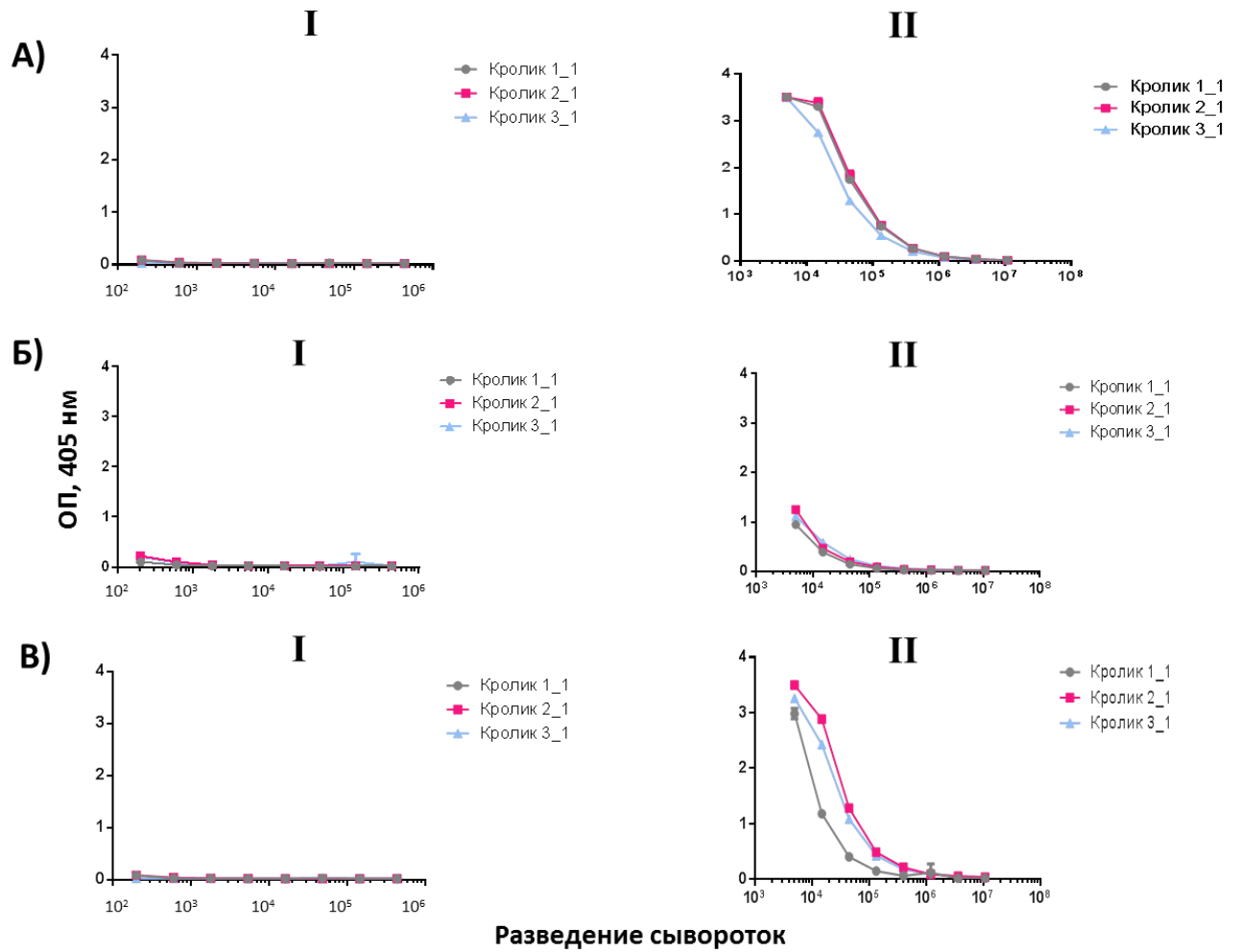


Рисунок 32. Результаты ИФА сывороток группы кроликов, иммунизированных МРЕР-ТВІ. А - в качестве антигена сорбирован белок МРЕР-ТВІ; Б - в качестве антигена сорбирован белок YkuJ-MРЕР; В - в качестве антигена сорбирован белок ТВІ_tag. I – сыворотки intactных животных, II – сыворотки после 4-й иммунизации

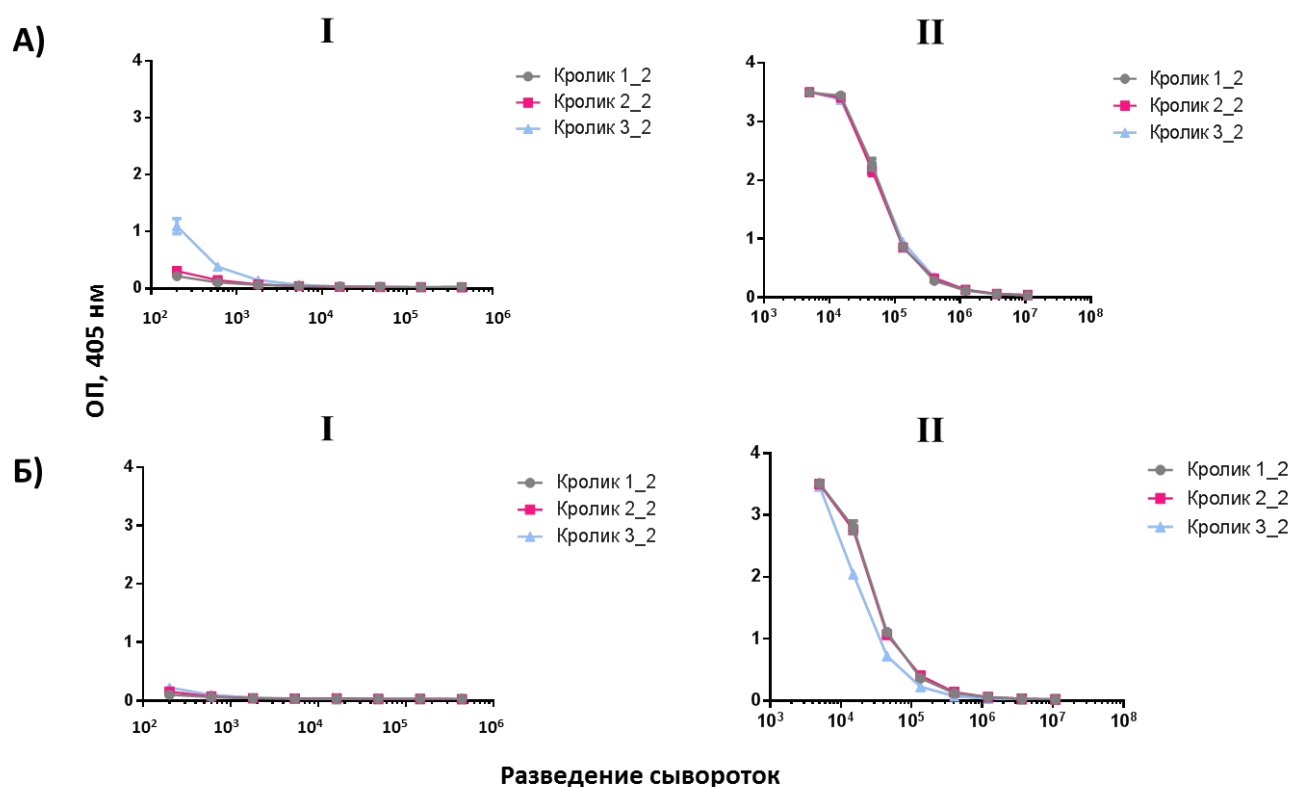


Рисунок 33. Результаты ИФА сывороток группы кроликов, иммунизированных YkuJ-MPER. А - в качестве антигена сорбирован белок YkuJ-MPER; Б - в качестве антигена сорбирован белок MPER-TBI. I – сыворотки intactных животных, II – сыворотки после 4-й иммунизации

С помощью тест-системы NewLAv blot было проведено исследование сывороток на наличие антител, специфичных к белкам ВИЧ-1. Было установлено, что сыворотки, полученные от кроликов, иммунизированных как MPER-TBI, так и YkuJ-MPER, содержат антитела к белкам gp160 и gp41, что свидетельствует в пользу того, что в сыворотках есть антитела специфичные к MPER (рисунок 34).

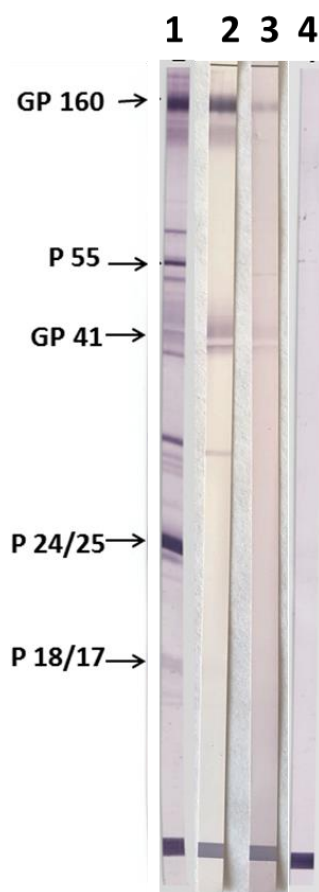


Рисунок 34. Анализ сывороток крови животных, иммунизированных белками MPER-TBI и YkuJ-MPER, с использованием коммерческой тест-системы New Lav blot 1. 1 – Положительный контроль из набора New LAV Blot; 2 – Сыворотки кроликов, иммунизированных MPER-TBI; 3 – Сыворотки кроликов, иммунизированных YkuJ-MPER; 4 – Преиммунные сыворотки кроликов

Основной целью при проектировании иммуногена YkuJ-MPER была имитация естественной конформационной подвижности MPER района. Разработанные нами конструкции, как новая, на основе белка YkuJ, так и созданная на базе хорошо изученного ранее иммуногена TBI, способны узнаваться bNAbs, мишенями для которых является мембрано-проксимальный район ВИЧ-1. Было показано взаимодействие с антителами 10E8 и 4E10, которые связываются с MPER в альфа-спиральной конформации, а также с антителом с 2F5, которое связывается с конформацией MPER без регулярной вторичной структуры. Перекрестные проверки иммуногенных свойств YkuJ-MPER и MPER-TBI показали, что обе конструкции способны вызывать анти-MPER антитела. Также показано, что в сыворотках иммунизированных животных содержатся антитела, специфичные к белкам ВИЧ-1.

Таким образом, конструкции, созданные и охарактеризованные в данной работе, могут служить для фокусирования гуморального иммунного ответа на MPER район, который считается одним из значимых регионов уязвимости ВИЧ-1.

Заключение

Создание эффективной вакцины против ВИЧ-1, учитывая его уникальные особенности, стало беспрецедентно сложной задачей, решение которой требует создания новых технологий и совместной работы исследователей из разных областей. За последние 40 лет, с тех пор как был обнаружен ВИЧ -1, наука сделала огромный шаг вперед. Были разработаны новые технологии, такие как массовое культивирование В клеток, компьютерное моделирования белков, анализ клеток с использованием многоцветного цитофлюориметра, ПЦР в реальном времени, новые методы секвенирования. Структура ВИЧ-1 была изучена в мельчайших подробностях. Открыто более сотни широконейтрализующих антител и картированы эпитопы, узнаваемые этими антителами. Совершенствуются подходы к разработке ВИЧ-иммуногенов.

В настоящее время считается, что создав иммуноген, способный индуцировать широконейтрализующие антитела, можно решить проблему создания эффективной профилактической вакцины. Работы в данном направлении ведутся очень активно, с использованием различных стратегий. Ряд иммуногенов создаются на основе тримерных молекул белка Env, другие – на основе компьютерного моделирования, с использованием знаний о конкретных эпитопах, узнаваемых широконейтрализующими антителами (Dumiak, 2018).

Разработка вакцины – многоступенчатый процесс, включающий как теоретический дизайн кандидатов, так и их экспериментальную проверку. Поскольку для ВИЧ-инфекции нет адекватной модели на животных, ответ на вопрос об эффективности вакцины могут дать только клинические испытания. Тем не менее, предварительные эксперименты на животных необходимы для выбора наиболее перспективного вакцинного кандидата,

В данном исследовании проведена работа по улучшению иммуногенных свойств искусственного полиэпипептидного белка TBI, который входил в состав вакцины КомбиВИЧвак, успешно прошедшей первую фазу клинических испытаний. С использованием компьютерного моделирования были спроектированы два варианта белка nTBI и MPER-TBI, в состав которых были включены эпитопы, узнаваемые широконейтрализующими антителами 2F5, 10E8, 4E10.

Кроме того, были получены химерные белки, несущие пептид-имитатор конформационного эпитопа, узнаваемого VRC01, отобранного с помощью технологии фагового дисплея. В качестве носителей пептида-имитатора bNAbs VRC01 были использованы белки скаффолды – nTBI и HBsAg. В качестве скаффолда для презентации MPER-фрагмента gp41 был также использован белок *Bacillus subtilis* YkuJ, C- и N-концевые фрагменты которого конформационно подобны MPER региону.

Было показано, что все полученные иммуногены обладают антигенностью ВИЧ-1 и способны индуцировать у иммунизированных животных ВИЧ-специфические антитела. При этом нами было показано, что созданный в процессе работы nTBI способен индуцировать вируснейтрализующие антитела более эффективно, чем исходный TBI.

Полученные в данной работе иммуногены могут быть использованы в разработке вакцины против ВИЧ 1 как на стадии создания иммуногена, так и при разработке различных схем прайм-бустерных протоколов иммунизации вакцинируемых, например, для стимуляции созревания широконейтрализующих антител с помощью иммунизации пациента промежуточными иммуногенами.

Выводы

1. Сконструирован иммуноген nTbI, в состав которого включены эпитопы, узнаваемые bNAbs 10E8, 4E10 и 2F5, а также линейный миметик конформационного эпитопа bNAb VRC01. Показано, что при иммунизации кроликов nTbI индуцирует образование вирус-специфичных антител, способных нейтрализовать молекулярный клон ВИЧ-1 92BR025 и env-псевдотипированные вирусы SF162 (tier 1) и QH (tier 2). Конкурентный анализ выявил, что nTbI индуцирует в большей степени 10E8-подобные антитела. Выяснено, что нейтрализующая активность антител против nTbI (IC_{50} 0,22 мкг/мл) выше, чем активность антител к исходному варианту TbI (IC_{50} 1,38 мкг/мл) к env-псевдовirusу SF162.

2. Получен химерный белок HBcAg-mimicVRC01, экспонирующий линейный пептид-имитатор конформационного эпитопа, узнаваемого bNAb VRC01. С помощью электронной микроскопии показано, что химерный белок (HBcAg-mimicVRC01) образует частицы, подобные нативному коровому белку вируса гепатита В. Установлено, что сыворотки животных, иммунизированных HBcAg-mimicVRC01, обладают вируснейтрализующей активностью в отношении молекулярного клона ВИЧ-1 92BR025.

3. Создан искусственный белок MPER-TbI, несущий мембрано-проксимальный регион gp41 на N- и C-концах молекулы. Согласно построенной пространственной модели, N- и C-концевые участки молекулы MPER-TbI являются альфа-спиральными, внутренний каркас молекулы представлен чередованием альфа-спиральных участков и петлевых структур. С помощью спектроскопии кругового дихроизма, подтверждено, что структура MPER-TbI является преимущественно α -спиральной (доля альфа спиралей равна 68 %). Показано, что химерный белок MPER-TbI обеспечивает в организме лабораторных животных выработку специфичных антител к MPER региону ВИЧ-1.

4. Теоретически обосновано и практически реализовано использование белка *B. subtilis* YkuJ в качестве носителя региона MPER ВИЧ-1. Получен химерный белок YkuJ-MPER. Согласно построенной модели химерного белка

YkuJ-MPER, его N- и С-концевые районы являются α -спиральными и доступны для связывания одновременно с двумя bNAbs 10E8. С помощью спектроскопии кругового дихроизма была подтверждена смоделированная пространственная структура рекомбинантного белка YkuJ-MPER. Показано, что химерный белок YkuJ-MPER обеспечивает в организме лабораторных животных выработку специфичных антител к соответствующему региону ВИЧ-1.

Благодарности

Особую благодарность и уважение автор выражает научному руководителю доктору биологических наук Карпенко Ларисе Ивановне. Автор искренне благодарен сотрудникам отдела биоинженерии д.б.н. Ильичеву А.А., к.б.н. Щербакову Д.Н., к.б.н. Чикаеву А.Н., Андреевой Н.Б., Каплиной О.Н.; сотрудникам теоретического отдела д.б.н. Бажану С.И., к.б.н. Бакулиной А.Ю., к.б.н. Антонцу Д.В.; сотрудникам отдела микроскопических исследований Зайцеву Б.Н., Таранову О.С. и сотруднику ИХБФМ СОРАН к.ф.-м.н. Ломзову А. А.

Список литературы

1. Бажан С. И., Белавин П. А., Серегин С. В., Данилюк Н. К., Бабкина И. Н., Карпенко Л. И., Некрасова Н. А., Лебедев Л. Р., Игнатьев Г. М., Агафонов А. П., Ильичев А. А., Сандахчиев Л. С. Конструирование искусственного иммуногена, кандидата ДНК-вакцины, кодирующей множественные СТЛ-эпитопы ВИЧ-1 // Доклады Академии наук. – 2004. – Т. 395. – № 6. – С. 825-827.
2. Веремейко Т. А., Лебедев Л. Р., Чикаев Н. А., Ильичев А. А., Карпенко Л. И. Гуморальный иммунный ответ у мышей линии BALB/c, иммунизированных химерными белками HBsAg, несущими эпитопы поверхностного белка вируса гепатита В // Вопросы вирусологии. – 2007. – № 1. – С. 40-45.
3. Взоров А. Н., Урываев Л. В. Критерии для индукции нейтрализующих антител широкого спектра действия против ВИЧ-1 с помощью вакцинации // Молекулярная биология. – 2017. – Т. 51. – № 6. – С. 945-957.
4. Гудима Г. О., Сидорович И. Г., Карамов Э. В., Решетников А. В., Хаитов Р. М. Клинические испытания и их вклад в совершенствование анти-ВИЧ/СПИД-вакцин // Физиология и патология иммунной системы. – 2007. – № 12. – С. 3-19.
5. Карпенко Л. И., Бажан С. И., Богрянцева М. П., Рындюк Н. Н., Гинько З. И., Кузубов В. И., Лебедев Л. Р., Каплина О. Н., Регузова А. Ю., Рыжиков А. Б., Усова С. В., Орешкова С. Ф., Нечаева Е. А., Даниленко Е. Д., Ильичев А. А. Комбинированная вакцина против ВИЧ-1 на основе искусственных полиэпитопных иммуногенов: результаты I фазы клинических испытаний // Биоорганическая химия. – 2016. – Т. 42. – № 2. – С. 191-204.
6. Михайлов А. М., Локтев В. Б., Лебедев Л. Р., Ерошкин А. М., Корнев А. Н., Корнилов В. В., Вайнштейн Б. К. Кристаллизация и рентгенодифракционное исследование строения искусственного белка ТВІ, экспериментальной многоэпитопной вакцины против ВИЧ-1 // Кристаллография. – 1999. – Т. 44. – № 5. – С. 930-932.

7. Мойса А. А. Иммуногенные конструкции на основе фрагментов оболочечного белка Е2 вируса гепатита С : дис. ... канд. биол. наук : 03.01.04. – М., 2011. – 160 с.
8. Мурашев Б. В., Казеннова Е. В., Козлов А. А., Мурашева И. В., Духовлинова Е. Н., Галачьянц Ю. П., Дорофеева Е. С., Духовлинов И. В., Машарский А. Э., Климов Н. А. Конструирование, очистка и иммунологические свойства кандидатной ДНК–вакцины против ВИЧ-1 // Русский журнал "СПИД, рак и общественное здоровье". – 2007. – Т. 11. – № 1. – С. 90.
9. Полежаева О. А., Щербаков Д. Н. Разработка панели псевдовиральных частиц, экспонирующих гликопротеин вируса Марбург // Международный научно-исследовательский журнал. – 2017. – Т. 8. – № 2. – С. 27-30.
10. Федеральный научно-методический Центр по профилактике и борьбе со СПИДом. – 2018. – Режим доступа: <http://www.hivrussia.ru>.
11. Чикаев А. Н., Пирожкова Д. С., Бакулина А. Ю., Федина Н. В., Карпенко Л. И., Ильичев А. А. Поиск пептидов-имитаторов эпитопа вич-1, узнаваемого нейтрализующим антителом VRC01 // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2013. – Т. 11. – № 2. – С. 13-19.
12. Afolabi B. A., Afolabi M. O., Afolabi A. A., Odewale M. A., Olowookere S. A. Roles of family dynamics on adherence to highly active antiretroviral therapy among people living with HIV/AIDS at a tertiary hospital in Osogbo, south-west Nigeria // African Health Sciences. – 2013. – V. 13. – № 4. – P. 920-926.
13. Agrawal N., Leaman D. P., Rowcliffe E., Kinkead H., Nohria R., Akagi J., Bauer K., Du S. X., Whalen R. G., Burton D. R., Zwick M. B. Functional Stability of Unliganded Envelope Glycoprotein Spikes among Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) // Plos One. – 2011. – V. 6. – № 6.
14. Azoitei M. L., Correia B. E., Ban Y. E. A., Carrico C., Kalyuzhniy O., Chen L., Schroeter A., Huang P. S., McLellan J. S., Kwong P. D., Baker D., Strong R. K., Schief W. R. Computation-Guided Backbone Grafting of a Discontinuous Motif onto a Protein Scaffold // Science. – 2011. – V. 334. – № 6054. – P. 373-376.

15. Banerjee S., Shi H., Habte H. H., Qin Y., Cho M. W. Modulating immunogenic properties of HIV-1 gp41 membrane-proximal external region by destabilizing six-helix bundle structure // *Virology*. – 2016. – V. 490. – P. 17-26.
16. Barré-Sinoussi F., Chermann J. C., Rey F., Nugeyre M. T., Chamaret S., Gruest J., Dautet C., Axlerblin C., Vezinetbrun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) // *Science*. – 1983. – V. 220. – № 4599. – P. 868-871.
17. Bazhan S. I., Karpenko L. I., Ilyicheva T. N., Belavin P. A., Seregin S. V., Danilyuk N. K., Antonets D. V., Ilyichev A. A. Rational design based synthetic polyepitope DNA vaccine for eliciting HIV-specific CD8⁺ T cell responses // *Molecular Immunology*. – 2010. – V. 47. – № 7-8. – P. 1507-1515.
18. Bazhan S. I., Karpenko L. I., Lebedev L. R., Uzhachenko R. V., Belavin P. A., Eroshkin A. M., Ilyichev A. A. A synergistic effect of a combined bivalent DNA-protein anti-HIV-I vaccine containing multiple T- and B-cell epitopes of HIV-1 proteins // *Molecular Immunology*. – 2008. – V. 45. – № 3. – P. 661-669.
19. Billich A. AIDSVAX (VaxGen) // *Current Opinion in Investigational Drugs*. – 2004. – V. 5. – № 2. – P. 214-221.
20. Binley J. M., Lybarger E. A., Crooks E. T., Seaman M. S., Gray E., Davis K. L., Decker J. M., Wycuff D., Harris L., Hawkins N., Wood B., Nathe C., Richman D., Tomaras G. D., Bibollet-Ruche F., Robinson J. E., Morris L., Shaw G. M., Montefiori D. C., Mascola J. R. Profiling the Specificity of Neutralizing Antibodies in a Large Panel of Plasmas from Patients Chronically Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes B and C // *Journal of Virology*. – 2008. – V. 82. – № 23. – P. 11651-11668.
21. Binley J. M., Sanders R. W., Clas B., Schuelke N., Master A., Guo Y., Kajumo F., Anselma D. J., Maddon P. J., Olson W. C., Moore J. P. A recombinant human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein complex stabilized by an intermolecular disulfide bond between the gp120 and gp41 subunits is an antigenic

mimic of the trimeric virion-associated structure // *Journal of Virology*. – 2000. – V. 74. – № 2. – P. 627-643.

22. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. – 2018. – Режим доступа: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

23. Bonsignori M., Liao H. X., Gao F., Williams W. B., Alam S. M., Montefiori D. C., Haynes B. F. Antibody-virus co-evolution in HIV infection: paths for HIV vaccine development // *Immunological Reviews*. – 2017. – V. 275. – № 1. – P. 145-160.

24. Borthwick N., Ahmed T., Ondondo B., Hayes P., Rose A., Ebrahimsa U., Hayton E. J., Black A., Bridgeman A., Rosario M., Hill A. V., Berrie E., Moyle S., Frahm N., Cox J., Colloca S., Nicosia A., Gilmour J., McMichael A. J., Dorrell L., Hanke T. Vaccine-elicited human T cells recognizing conserved protein regions inhibit HIV-1 // *Molecular Therapy*. – 2014. – V. 22. – № 2. – P. 464-475.

25. Borthwick N., Lin Z., Akahoshi T., Llano A., Silva-Arrieta S., Ahmed T., Dorrell L., Brander C., Murakoshi H., Takiguchi M., Hanke T. Novel, in-natural-infection subdominant HIV-1 CD8+ T-cell epitopes revealed in human recipients of conserved-region T-cell vaccines // *PLoS One*. – 2017. – V. 12. – № 4.

26. Briney B., Sok D., Jardine J. G., Kulp D. W., Skog P., Menis S., Jacak R., Kalyuzhniy O., de Val N., Sesterhenn F., Le K. M., Ramos A., Jones M., Saye-Francisco K. L., Blane T. R., Spencer S., Georgeson E., Hu X., Ozorowski G., Adachi Y., Kubitz M., Sarkar A., Wilson I. A., Ward A. B., Nemazee D., Burton D. R., Schief W. R. Tailored Immunogens Direct Affinity Maturation toward HIV Neutralizing Antibodies // *Cell*. – 2016. – V. 166. – № 6. – P. 1459-1470.

27. Burton D. R. Scaffolding to build a rational vaccine design strategy // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – V. 107. – № 42. – P. 17859-17860.

28. Burton D. R., Ahmed R., Barouch D. H., Butera S. T., Crotty S., Godzik A., Kaufmann D. E., McElrath M. J., Nussenzweig M. C., Pulendran B., Scanlan C. N., Schief W. R., Silvestri G., Streeck H., Walker B. D., Walker L. M., Ward A. B., Wilson

I. A., Wyatt R. A Blueprint for HIV Vaccine Discovery // *Cell Host & Microbe*. – 2012. – V. 12. – № 4. – P. 396-407.

29. Burton D. R., Mascola J. R. Antibody responses to envelope glycoproteins in HIV-1 infection // *Nature Immunology*. – 2015. – V. 16. – № 6. – P. 571-576.

30. Cardoso R. M. F., Brunel F. M., Ferguson S., Zwick M., Burton D. R., Dawson P. E., Wilson I. A. Structural basis of enhanced binding of extended and helically constrained peptide epitopes of the broadly neutralizing HIV-1 antibody 4E10 // *Journal of Molecular Biology*. – 2007. – V. 365. – № 5. – P. 1533-1544.

31. Cerutti N., Loredó-Varela J. L., Caillat C., Weissenhorn W. Antigen 41 membrane proximal external region antibodies and the art of using the membrane for neutralization // *Current Opinion in HIV and AIDS*. – 2017. – V. 12. – № 3. – P. 250-256.

32. Chikhaev A. N., Bakulina A. Y., Burdick R. C., Karpenko L. I., Pathak V. K., Ilyichev A. A. Selection of Peptide Mimics of HIV-1 Epitope Recognized by Neutralizing Antibody VRC01 // *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – № 3. – P. e0120847.

33. Clavel F., Guetard D., Brunvezinet F., Chamaret S., Rey M. A., Santosferreira M. O., Laurent A. G., Dauguet C., Katlama C., Rouzioux C., Klatzmann D., Champalimaud J. L., Montagnier L. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS // *Science*. – 1986. – V. 233. – № 4761. – P. 343-346.

34. ClinicalTrials.gov: a database of privately and publicly funded clinical studies conducted around the world. – 2018. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/>.

35. Correia B. E., Ban Y. E. A., Holmes M. A., Xu H., Ellingson K., Kraft Z., Carrico C., Boni E., Sather D. N., Zenobia C., Burke K. Y., Bradley-Hewitt T., Bruhn-Johannsen J. F., Kalyuzhniy O., Baker D., Strong R. K., Stamatatos L., Schief W. R. Computational design of epitope-scaffolds allows induction of antibodies specific for a poorly immunogenic HIV vaccine epitope // *Structure*. – 2010. – V. 18. – № 9. – P. 1116-1126.

36. Crooks A. M., Bateson R., Cope A. B., Dahl N. P., Griggs M. K., Kuruc J. D., Gay C. L., Eron J. J., Margolis D. M., Bosch R. J., Archin N. M. Precise

Quantitation of the Latent HIV-1 Reservoir: Implications for Eradication Strategies // *Journal of Infectious Diseases*. – 2015. – V. 212. – № 9. – P. 1361-1365.

37. Crooks E. T., Tong T., Osawa K., Binley J. M. Enzyme Digests Eliminate Nonfunctional Env from HIV-1 Particle Surfaces, Leaving Native Env Trimers Intact and Viral Infectivity Unaffected // *Journal of Virology*. – 2011. – V. 85. – № 12. – P. 5825-5839.

38. Dey A. K., Cupo A., Ozorowski G., Sharma V. K., Behrens A. J., Go E. P., Ketas T. J., Yasmeeen A., Klasse P. J., Sayeed E., Desaire H., Crispin M., Wilson I. A., Sanders R. W., Hassell T., Ward A. B., Moore J. P. cGMP production and analysis of BG505 SOSIP.664, an extensively glycosylated, trimeric HIV-1 envelope glycoprotein vaccine candidate // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2018. – V. 115. – № 4. – P. 885-899.

39. Dumiak M. A fast track for vaccine development // *IAVI report*. – 2018. – V. 22. – № 2.

40. Earl P. L., Broder C. C., Long D., Lee S. A., Peterson J., Chakrabarti S., Doms R. W., Moss B. Native oligomeric human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein elicits diverse monoclonal antibody reactivities // *Journal of Virology*. – 1994. – V. 68. – № 5. – P. 3015-3026.

41. Earl P. L., Koenig S., Moss B. Biological and immunological properties of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: analysis of proteins with truncations and deletions expressed by recombinant vaccinia viruses // *Journal of Virology*. – 1991. – V. 65. – № 1. – P. 31-41.

42. Eckert D. M., Kim P. S. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition // *Annual Review of Biochemistry*. – 2001. – V. 70. – P. 777-810.

43. Eisinger R. W., Fauci A. S. Ending the HIV/AIDS Pandemic // *Emerging Infectious Diseases*. – 2018. – V. 24. – № 3. – P. 413-416.

44. Eroshkin A. M., Karginova E. A., Gileva I. P., Lomakin A. S., Lebedev L. R., Kamyinina T. P., Pereboev A. V., Ignat'ev G. M. Design of four-helix bundle protein as a candidate for HIV vaccine // *Protein Engineering, Design and Selection*. – 1995. – V. 8. – № 2. – P. 167-173.

45. Eroshkin A. M., Zhilkin P. A., Shamin V. V., Korolev S., Fedorov B. B. Artificial protein vaccines with predetermined tertiary structure: Application to anti-HTV-1 vaccine design // *Protein Engineering, Design and Selection*. – 1993. – V. 6. – № 8. – P. 997-1001.
46. Esparza J. Solid vaccine protection against SIV in rhesus monkeys provides proof-of-concept for further evaluation of a novel HIV vaccine approach in humans // *Expert Review of Vaccines*. – 2012. – V. 11. – № 5. – P. 539-542.
47. Euler Z., van Gils M. J., Bunnik E. M., Phung P., Schweighardt B., Wrin T., Schuitemaker H. Cross-Reactive Neutralizing Humoral Immunity Does Not Protect from HIV Type 1 Disease Progression // *Journal of Infectious Diseases*. – 2010. – V. 201. – № 7. – P. 1045-1053.
48. Fauci A. S. An HIV vaccine is essential for ending the HIV/AIDS pandemic // *JAMA - Journal of the American Medical Association*. – 2017. – V. 318. – № 16. – P. 1535-1536.
49. Fischer W., Perkins S., Theiler J., Bhattacharya T., Yusim K., Funkhouser R., Kuiken C., Haynes B., Letvin N. L., Walker B. D., Hahn B. H., Korber B. T. Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants // *Nature Medicine*. – 2007. – V. 13. – № 1. – P. 100-106.
50. Flynn M. N., Forthal D. N., Harro C. D., Judson F. N., Mayer K. H., Para M. F., Gilbert P. B., Hudgens M. G., Metch B. J., Self S. G., Berman P. W., Francis D. P., Gurwith M., Heyward W. L., Jobes D. V., Peterson M. L., Popovic V., Sinangil F. M., Gurwith M., Jobes D. V., Peterson M. L., Sinangil F. M., Berman P. W., Francis D. P., Heyward W. L., Gilbert P. B., Hudgens M. G., Metch B. J., Self S. G., Adamczyk A., Baker R. L., Brand D., Brown S. J., Buchbinder S., Buggy B. P., Cade J., Caldwell M. C., Celum C., Creticos C., Coutinho R. A., Lindenburg K., Daly P., DeJesus E., DiCarlo R., Fenstersheib M., Flynn N., Forthal D., Gripshover B., Gorse G. J., Belshe R., Grossman H., Harro C. D., Henry K., Hewitt R. G., Hogg R., Jacobson J. M., Jemsek J., Judson F., Kahn J. O., Keefer M. C., Kessler H., Koblin B., Kostman J., Lally M., Logue K., Marmor M., Mayer K., McKinsey D., Miskin B. M., Morales J. O., Mulligan M. J., Myers R. A., Novak R., Para M., Piliero P., Pobleto R., Rhame F., Riddler S.,

Richter R. W., Sampson J. H., Sands M., Santiago S., Shikuma C., Somero M. S., Thomas E., Thompson M., Tying S. K., Vincelette J., Vrooman P. S., Yangco B. G., rgp H. I. V. V. S. G. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection // *Journal of Infectious Diseases*. – 2005. – V. 191. – № 5. – P. 654-665.

51. Freed E. O. HIV-1 assembly, release and maturation // *Nature Reviews Microbiology*. – 2015. – V. 13. – № 8. – P. 484-496.

52. Gazarian K. G., Palacios-Rodríguez Y., Gazarian T. G., Huerta L. HIV-1 V3 loop crown epitope-focused mimotope selection by patient serum from random phage display libraries: Implications for the epitope structural features // *Molecular Immunology*. – 2013. – V. 54. – № 2. – P. 148-156.

53. Gel-Pro Analyzer Image Analysis Software. – 2018. – Режим доступа: <https://www.meyerinst.com/imaging-software/image-pro/gel/index.htm>.

54. GenScript. – 2018. – Режим доступа: <https://www.genscript.com>.

55. Georgiev I. S., Joyce M. G., Zhou T. Q., Kwong P. D. Elicitation of HIV-1-neutralizing antibodies against the CD4-binding site // *Current Opinion in HIV and AIDS*. – 2013. – V. 8. – № 5. – P. 382-392.

56. Gilbert L., Walker L. 'My biggest fear was that people would reject me once they knew my status...': stigma as experienced by patients in an HIV/AIDS clinic in Johannesburg, South Africa // *Health & Social Care in the Community*. – 2010. – V. 18. – № 2. – P. 139-146.

57. Go E. P., Herschhorn A., Gu C., Castillo-Menendez L., Zhang S. J., Mao Y. D., Chen H. Y., Ding H. T., Wakefield J. K., Hua D., Liao H. X., Kappes J. C., Sodroski J., Desaire H. Comparative Analysis of the Glycosylation Profiles of Membrane-Anchored HIV-1 Envelope Glycoprotein Trimers and Soluble gp140 // *Journal of Virology*. – 2015. – V. 89. – № 16. – P. 8245-8257.

58. Gonzalez N., McKee K., Lynch R. M., Georgiev I. S., Jimenez L., Grau E., Yuste E., Kwong P. D., Mascola J. R., Alcamí J. Characterization of broadly neutralizing antibody responses to HIV-1 in a cohort of long term non-progressors // *Plos One*. – 2018. – V. 13. – № 3.

59. Goo L., Chohan V., Nduati R., Overbaugh J. Early development of broadly neutralizing antibodies in HIV-1-infected infants // *Nature Medicine*. – 2014. – V. 20. – № 6. – P. 655-658.
60. Gottlieb M. S., Schroff R., Schanker H. M., Weisman J. D., Fan P. T., Wolf R. A., Saxon A. *Pneumocystis-carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men - evidence of a new acquired cellular immunodeficiency // *New England Journal of Medicine*. – 1981. – V. 305. – № 24. – P. 1425-1431.
61. Gray G. E., Allen M., Moodie Z., Churchyard G., Bekker L. G., Nchabeleng M., Mlisana K., Metch B., de Bruyn G., Latka M. H., Roux S., Mathebula M., Naicker N., Ducar C., Carter D. K., Puren A., Eaton N., McElrath M. J., Robertson M., Corey L., Kublin J. G., Team H. P. S. Safety and efficacy of the HVTN 503/Phambili Study of a clade-B-based HIV-1 vaccine in South Africa: a double-blind, randomised, placebo-controlled test-of-concept phase 2b study // *Lancet Infectious Diseases*. – 2011. – V. 11. – № 7. – P. 507-515.
62. Guatelli J. C. Interactions of Viral protein U (Vpu) with Cellular Factors / *Hiv Interactions with Host Cell Proteins*. 2009. – V. 339. – P. 27-45.
63. Gudima G., Nikolaeva I., Korobova S., Gomostaeva J., Klimenko T., Chevalier A., Trubcheninova L., Trefilieva N., Gorbunova Z., Ischenko M., Petrova T., Trofimov D., Alexeev L., Pinegin B., Chernousov A., Latysheva T., Ilina N., Karamov E., Sidorovich I. Cohort formation for first clinical trials of HIV/AIDS vaccine in Russian Federation // *Antiviral Therapy*. – 2007. – № 12. – P. 131.
64. Habte H. H., Banerjee S., Shi H., Qin Y., Cho M. W. Immunogenic properties of a trimeric gp41-based immunogen containing an exposed membrane-proximal external region // *Virology*. – 2015. – V. 486. – P. 187-197.
65. Hanke T. Conserved immunogens in prime-boost strategies for the next-generation HIV-1 vaccines // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2014. – V. 14. – № 5. – P. 601-616.
66. Harrison S. C. Viral membrane fusion // *Virology*. – 2015. – V. 479. – P. 498-507.

67. Haynes B. F. New approaches to HIV vaccine development // *Current Opinion in Immunology*. – 2015. – V. 35. – P. 39-47.
68. Haynes B. F., Burton D. R. Developing an HIV vaccine // *Science*. – 2017. – V. 355. – № 6330. – P. 1129-1130.
69. Haynes B. F., Gilbert P. B., McElrath M. J., Zolla-Pazner S., Tomaras G. D., Alam S. M., Evans D. T., Montefiori D. C., Karnasuta C., Sutthent R., Liao H. X., DeVico A. L., Lewis G. K., Williams C., Pinter A., Fong Y., Janes H., DeCamp A., Huang Y. D., Rao M., Billings E., Karasavvas N., Robb M. L., Ngauy V., de Souza M. S., Paris R., Ferrari G., Bailer R. T., Soderberg K. A., Andrews C., Berman P. W., Frahm N., De Rosa S. C., Alpert M. D., Yates N. L., Shen X. Y., Koup R. A., Pitisuttithum P., Kaewkungwal J., Nitayaphan S., Rerks-Ngarm S., Michael N. L., Kim J. H. Immune-Correlates Analysis of an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial // *New England Journal of Medicine*. – 2012. – V. 366. – № 14. – P. 1275-1286.
70. Haynes B. F., Moody M. A., Alam M., Bonsignori M., Verkoczy L., Ferrari G., Gao F., Tomaras G. D., Liao H. X., Kelsoe G. Progress in HIV-1 vaccine development // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2014. – V. 134. – № 1. – P. 3-10.
71. Hraber P., Seaman M. S., Bailer R. T., Mascola J. R., Montefiori D. C., Korber B. T. Prevalence of broadly neutralizing antibody responses during chronic HIV-1 infection // *AIDS*. – 2014. – V. 28. – № 2. – P. 163-169.
72. Hsu D. C., O'Connell R. J. Progress in HIV vaccine development // *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. – 2017. – V. 13. – № 5. – P. 1018-1030.
73. Huang J., Ofek G., Laub L., Louder M. K., Doria-Rose N. A., Longo N. S., Imamichi H., Bailer R. T., Chakrabarti B., Sharma S. K., Alam S. M., Wang T., Yang Y., Zhang B., Migueles S. A., Wyatt R., Haynes B. F., Kwong P. D., Mascola J. R., Connors M. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody // *Nature*. – 2012. – V. 491. – № 7424. – P. 406-412.
74. I-TASSER: Iterative Threading ASSEmbly Refinement. – 2018. – Режим доступа: <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>.

75. IAVIRreport. The publication on AIDS vaccine research. – 2018. – Режим доступа: <http://www.iavireport.org/>.
76. Jeffs S. A., Goriup S., Kebble B., Crane D., Bolgiano B., Sattentau Q., Jones S., Holmes H. Expression and characterisation of recombinant oligomeric envelope glycoproteins derived from primary isolates of HIV-1 // *Vaccine*. – 2004. – V. 22. – № 8. – P. 1032-1046.
77. Johnston M. I., Fauci A. S. HIV Vaccine Development - Improving on Natural Immunity // *New England Journal of Medicine*. – 2011. – V. 365. – № 10. – P. 873-875.
78. Karpenko L. I., Bazhan S. I., Antonets D. V., Belyakov I. M. Novel approaches in polyepitope T-cell vaccine development against HIV-1 // *Expert Review of Vaccines*. – 2014. – V. 13. – № 1. – P. 155-173.
79. Karpenko L. I., Bazhan S. I., Bogryantseva M. P., Ryndyuk N. N., Ginko Z. I., Kuzubov V. I., Lebedev L. R., Kaplina O. N., Reguzova A. Y., Ryzhikov A. B., Usova S. V., Oreshkova S. F., Nechaeva E. A., Danilenko E. D., Ilyichev A. A. Results of phase I clinical trials of a combined vaccine against HIV-1 based on synthetic polyepitope immunogens // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2016. – V. 42. – № 2. – P. 170-182.
80. Karpenko L. I., Ilyichev A. A., Eroshkin A. M., Lebedev L. R., Uzhachenko R. V., Nekrasova N. A., Plyasunova O. A., Belavin P. A., Seregin S. V., Danilyuk N. K., Zaitsev B. N., Danilenko E. D., Masycheva V. I., Bazhan S. I. Combined virus-like particle-based polyepitope DNA/protein HIV-1 vaccine. Design, immunogenicity and toxicity studies // *Vaccine*. – 2007. – V. 25. – № 21. – P. 4312-4323.
81. Karpenko L. I., Lebedev L. R., Bazhan S. I., Korneev D. V., Zaitsev B. B., Ilyichev A. A. Visualization of CombiHIVvac Vaccine Particles Using Electron Microscopy // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2017. – V. 33. – № 4. – P. 323-324.
82. Karpenko L. I., Nekrasova N. A., Ilyichev A. A., Lebedev L. R., Ignatyev G. M., Agafonov A. P., Zaitsev B. N., Belavin P. A., Seregin S. V., Danilyuk N. K.,

Babkina I. N., Bazhan S. I. Comparative analysis using a mouse model of the immunogenicity of artificial VLP and attenuated Salmonella strain carrying a DNA-vaccine encoding HIV-1 polyepitope CTL-immunogen // *Vaccine*. – 2004. – V. 22. – № 13-14. – P. 1692-1699.

83. Karpenko L. I., Scherbakova N. S., Chikaev A. N., Tumanova O. Y., Lebedev L. R., Shalamova L. A., Pyankova O. G., Ryzhikov A. B., Ilyichev A. A. Polyepitope protein incorporated the HIV-1 mimotope recognized by monoclonal antibody 2G12 // *Molecular Immunology*. – 2012. – V. 50. – № 4. – P. 193-199.

84. Khayat R., Lee J. H., Julien J. P., Cupo A., Klasse P. J., Sanders R. W., Moore J. P., Wilson I. A., Ward A. B. Structural Characterization of Cleaved, Soluble HIV-1 Envelope Glycoprotein Trimers // *Journal of Virology*. – 2013. – V. 87. – № 17. – P. 9865-9872.

85. Klasse P. J., Depetris R. S., Pejchal R., Julien J. P., Khayat R., Lee J. H., Marozsan A. J., Cupo A., Cocco N., Korzun J., Yasmeeen A., Ward A. B., Wilson I. A., Sanders R. W., Moore J. P. Influences on Trimerization and Aggregation of Soluble, Cleaved HIV-1 SOSIP Envelope Glycoprotein // *Journal of Virology*. – 2013. – V. 87. – № 17. – P. 9873-9885.

86. Klein F., Mouquet H., Dosenovic P., Scheid J. F., Scharf L., Nussenzweig M. C. Antibodies in HIV-1 Vaccine Development and Therapy // *Science*. – 2013. – V. 341. – № 6151. – P. 1199-1204.

87. Korber B., Hraber P., Wagh K., Hahn B. H. Polyvalent vaccine approaches to combat HIV-1 diversity // *Immunological Reviews*. – 2017. – V. 275. – № 1. – P. 230-244.

88. Korobova S., Chevalier A., Nikolaeva I., Gudima G., Gornostaeva Y., Trubcheninova L., Chernousov A., Pinegin B., Karamov E., Pavlova T., Kornilaeva G., Petrova T., Trofimov D., Sidorovich I. Phase I Clinical Trials of a Candidate Vaccine Based on Fusion Recombinant Gag-gp41 Protein in Healthy HIV Negative Volunteers // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2008. – V. 24. – P. 146-146.

89. Korobova S., Nikolaeva I., Chevalier A., Gornostaeva Y., Trubcheniniva L., Gorbunova Z., Gudima G., Pinegin B., Chernousov A., Petrova T., Trofimov D.,

Sidorovich I. Analysis of the safety and the immunogenicity of the gag-env HIV1 recombinant protein-based vaccine "VICHREPOL" in healthy adults // *Allergy*. – 2007. – V. 62. – P. 493-493.

90. Kwong P. D., Mascola J. R. Human Antibodies that Neutralize HIV-1: Identification, Structures, and B Cell Ontogenies // *Immunity*. – 2012. – V. 37. – № 3. – P. 412-425.

91. Kwong P. D., Mascola J. R., Nabel G. J. Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning // *Nature Reviews Immunology*. – 2013. – V. 13. – № 9. – P. 693-701.

92. Leaman D. P., Lee J. H., Ward A. B., Zwick M. B. Immunogenic display of purified chemically cross-linked HIV-1 spikes // *Journal of Virology*. – 2015. – V. 89. – № 13. – P. 6725-6745.

93. Levy J. A. HIV and the Pathogenesis of AIDS, 3rd Edition. – USA: American Society for Microbiology, 2007. – 661 p.

94. Lorenzo-Redondo R., Fryer H. R., Bedford T., Kim E. Y., Archer J., Kosakovsky Pond S. L., Chung Y. S., Penugonda S., Chipman J. G., Fletcher C. V., Schacker T. W., Malim M. H., Rambaut A., Haase A. T., McLean A. R., Wolinsky S. M. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy // *Nature*. – 2016. – V. 530. – № 7588. – P. 51-56.

95. Malim M. H., Emerman M. HIV-1 accessory proteins - Ensuring viral survival in a hostile environment // *Cell Host & Microbe*. – 2008. – V. 3. – № 6. – P. 388-398.

96. Marx J. L. New disease baffles medical community // *Science*. – 1982. – V. 217. – № 4560. – P. 618-621.

97. Mascola J. R., Haynes B. F. HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's pathways // *Immunological Reviews*. – 2013. – V. 254. – P. 225-244.

98. McCoy L. E., Burton D. R. Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV // *Immunological Reviews*. – 2017. – V. 275. – № 1. – P. 11-20.

99. McGovern S. L., Caselli E., Grigorieff N., Shoichet B. K. A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2002. – V. 45. – № 8. – P. 1712-1722.
100. McMichael A. J., Hanke T. HIV vaccines 1983-2003 // *Nature Medicine*. – 2003. – V. 9. – № 7. – P. 874-880.
101. McMichael A. J., Haynes B. F. Lessons learned from HIV-1 vaccine trials: New priorities and directions // *Nature Immunology*. – 2012. – V. 13. – № 5. – P. 423-427.
102. Medina-Ramirez M., Garces F., Escolano A., Skog P., de Taeye S. W., Del Moral-Sanchez I., McGuire A. T., Yasmeen A., Behrens A. J., Ozorowski G., van den Kerkhof T., Freund N. T., Dosenovic P., Hua Y. Z., Gitlin A. D., Cupo A., van der Woude P., Golabek M., Sliepen K., Blane T., Kootstra N., van Breemen M. J., Pritchard L. K., Stanfield R. L., Crispin M., Ward A. B., Stamatatos L., Klasse P. J., Moore J. P., Nemazee D., Nussenzweig M. C., Wilson I. A., Sanders R. W. Design and crystal structure of a native-like HIV-1 envelope trimer that engages multiple broadly neutralizing antibody precursors in vivo // *Journal of Experimental Medicine*. – 2017. – V. 214. – № 9. – P. 2573-2590.
103. Medina-Ramirez M., Sanchez-Merino V., Sanchez-Palomino S., Merino-Mansilla A., Ferreira C. B., Perez I., Gonzalez N., Alvarez A., Alcocer-Gonzalez J. M., Garcia F., Gatell J. M., Alcamí J., Yuste E. Broadly Cross-Neutralizing Antibodies in HIV-1 Patients with Undetectable Viremia // *Journal of Virology*. – 2011. – V. 85. – № 12. – P. 5804-5813.
104. Medina-Ramírez M., Sanders R. W., Sattentau Q. J. Stabilized HIV-1 envelope glycoprotein trimers for vaccine use // *Current Opinion in HIV and AIDS*. – 2017. – V. 12. – № 3. – P. 241-249.
105. Melikyan G. B. Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm // *Retrovirology*. – 2008. – V. 5.
106. Menendez A., Calarese D. A., Stanfield R. L., Chow K. C., Scanlan C. N., Kunert R., Katinger H., Burton D. R., Wilson I. A., Scott J. K. A peptide inhibitor of

HIV-1 neutralizing antibody 2G12 is not a structural mimic of the natural carbohydrate epitope on gp120 // *FASEB Journal*. – 2008. – V. 22. – № 5. – P. 1380-1392.

107. Modeller: Program for comparative protein structure modelling by satisfaction of spatial restraints. – 2018. – Режим доступа: <https://salilab.org/modeller>.

108. Montefiori D. C. Measuring HIV neutralization in a luciferase reporter gene assay // *Methods in Molecular Biology*. – 2009. – V. 485. – P. 395-405.

109. Moore J. P. HIV vaccines. Back to primary school // *Nature*. – 1995. – V. 376. – № 6536. – P. 115-115.

110. Moore P. L., Crooks E. T., Porter L., Zhu P., Cayanan C. S., Grise H., Corcoran P., Zwick M. B., Franti M., Morris L., Roux K. H., Burton D. R., Binley J. M. Nature of nonfunctional envelope proteins on the surface of human immunodeficiency virus type 1 // *Journal of Virology*. – 2006. – V. 80. – № 5. – P. 2515-2528.

111. Mouquet H., Nussenzweig M. C. HIV Roadmaps to a vaccine // *Nature*. – 2013. – V. 496. – № 7446. – P. 441-442.

112. Munoz-Barroso I., Salzwedel K., Hunter E., Blumenthal R. Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion // *Journal of Virology*. – 1999. – V. 73. – № 7. – P. 6089-6092.

113. Nabel G. J. Designing Tomorrow's Vaccines // *New England Journal of Medicine*. – 2013. – V. 368. – № 6. – P. 551-560.

114. Nomaguchi M., Fujita M., Adachi A. Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis // *Microbes and Infection*. – 2008. – V. 10. – № 9. – P. 960-967.

115. O'Connell R. J., Kim J. H., Corey L., Michael N. L. Human immunodeficiency virus vaccine trials // *Cold Spring Harb Perspect Med*. – 2012. – V. 2. – № 12. – P. a007351.

116. Ofek G., Guenaga F. J., Schief W. R., Skinner J., Baker D., Wyatt R., Kwong P. D. Elicitation of structure-specific antibodies by epitope scaffolds // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – V. 107. – № 42. – P. 17880-17887.

117. Ondondo B., Murakoshi H., Clutton G., Abdul-Jawad S., Wee E. G. T., Gatanaga H., Oka S., McMichael A. J., Takiguchi M., Korber B., Hanke T. Novel conserved-region T-cell mosaic vaccine with high global HIV-1 coverage is recognized by protective responses in untreated infection // *Molecular Therapy*. – 2016. – V. 24. – № 4. – P. 832-842.
118. Pancera M., Zhou T. Q., Druz A., Georgiev I. S., Soto C., Gorman J., Huang J. H., Acharya P., Chuang G. Y., Ofek G., Stewart-Jones G. B. E., Stuckey J., Bailer R. T., Joyce M. G., Louder M. K., Tumba N., Yang Y. P., Zhang B. S., Cohen M. S., Haynes B. F., Mascola J. R., Morris L., Munro J. B., Blanchard S. C., Mothes W., Connors M., Kwong P. D. Structure and immune recognition of trimeric pre-fusion HIV-1 Env // *Nature*. – 2014. – V. 514. – № 7523. – P. 455-461.
119. Parren P., Burton D. R., Sattentau Q. J. HIV-1 antibody - Debris or virion? // *Nature Medicine*. – 1997. – V. 3. – № 4. – P. 366-367.
120. Perczel A., Hollosi M., Tusnady G., Fasman G. D. Convex constraint analysis: a natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins // *Protein Engineering*. – 1991. – V. 4. – № 6. – P. 669-679.
121. Pitisuttithum P., Gilbert P., Gurwith M., Heyward W., Martin M., van Griensven F., Hu D., Tappero J. W., Choopanya K., Bangkok Vaccine E. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand // *Journal of Infectious Diseases*. – 2006. – V. 194. – № 12. – P. 1661-1671.
122. Poignard P., Moulard M., Golez E., Vivona V., Franti M., Venturini S., Wang M., Parren P., Burton D. R. Heterogeneity of envelope molecules expressed on primary human immunodeficiency virus type 1 particles as probed by the binding of neutralizing and nonneutralizing antibodies // *Journal of Virology*. – 2003. – V. 77. – № 1. – P. 353-365.
123. Popovic M., Sarngadharan M. G., Read E., Gallo R. C. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS // *Science*. – 1984. – V. 224. – № 4648. – P. 497-500.

124. Pudney J., Song M. J. Electron microscopic analysis of HIV-host cell interactions // *Tissue & Cell*. – 1994. – V. 26. – № 4. – P. 539-550.
125. Pumpens P., Grens E. The true story and advantages of the famous Hepatitis B virus core particles: Outlook 2016 // *Molecular Biology*. – 2016. – V. 50. – № 4. – P. 489-509.
126. Purtscher M., Trkola A., Gruber G., Buchacher A., Predl R., Steindl F., Tauer C., Berger R., Barrett N., Jungbauer A., Katinger H. A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1 // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 1994. – V. 10. – № 12. – P. 1651-1658.
127. PyMOL by Schrödinger. V. 2.2. – 2018. – Режим доступа: <https://pymol.org/2>.
128. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria : the R Foundation for Statistical Computing. – 2016. – Режим доступа: <https://www.r-project.org>.
129. Reguzova A., Antonets D., Karpenko L., Ilyichev A., Maksyutov R., Bazhan S. Design and Evaluation of Optimized Artificial HIV-1 Poly-T Cell-Epitope Immunogens // *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – № 3. – P. e0116412.
130. Rerks-Ngarm S., Pitisuttithum P., Nitayaphan S., Kaewkungwal J., Chiu J., Paris R., Prem Sri N., Namwat C., De Souza M., Adams E., Benenson M., Gurunathan S., Tartaglia J., McNeil J. G., Francis D. P., Stablein D., Birx D. L., Chunsuttiwat S., Khamboonruang C., Thongcharoen P., Robb M. L., Michael N. L., Kunasol P., Kim J. H. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand // *New England Journal of Medicine*. – 2009. – V. 361. – № 23. – P. 2209-2220.
131. Ringe R. P., Yasmeen A., Ozorowski G., Go E. P., Pritchard L. K., Guttman M., Ketas T. A., Cottrell C. A., Wilson I. A., Sanders R. W., Cupo A., Crispin M., Lee K. K., Desaire H., Ward A. B., Klasse P. J., Moore J. P. Influences on the Design and Purification of Soluble, Recombinant Native-Like HIV-1 Envelope Glycoprotein Trimers // *Journal of Virology*. – 2015. – V. 89. – № 23. – P. 12189-12210.

132. Sahay B., Nguyen C. Q., Yamamoto J. K. Conserved HIV Epitopes for an Effective HIV Vaccine // *Journal of Clinical and Cellular Immunology*. – 2017. – V. 8. – № 4.

133. Salzwedel K., West J. T., Hunter E. A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity // *Journal of Virology*. – 1999. – V. 73. – № 3. – P. 2469-2480.

134. Sanders R. W., Derking R., Cupo A., Julien J. P., Yasmeen A., de Val N., Kim H. J., Blattner C., de la Pena A. T., Korzun J., Golabek M., de los Reyes K., Ketas T. J., van Gils M. J., King C. R., Wilson I. A., Ward A. B., Klasse P. J., Moore J. P. A Next-Generation Cleaved, Soluble HIV-1 Env Trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, Expresses Multiple Epitopes for Broadly Neutralizing but Not Non-Neutralizing Antibodies // *PLoS Pathogens*. – 2013. – V. 9. – № 9.

135. Sanders R. W., Moore J. P. A stamp on the envelope // *Nature*. – 2014. – V. 514. – № 7523. – P. 437-438.

136. Sanders R. W., Venturi M., Schiffner L., Kalyanaraman R., Katinger H., Lloyd K. O., Kwong P. D., Moore J. P. The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120 // *Journal of Virology*. – 2002. – V. 76. – № 14. – P. 7293-7305.

137. Sandström E., Nilsson C., Hejdeman B., Bråve A., Bratt G., Robb M., Cox J., VanCott T., Marovich M., Stout R., Aboud S., Bakari M., Pallangyo K., Ljungberg K., Moss B., Earl P., Michael N., Birx D., Mhalu F., Wahren B., Biberfeld G., Edbäck U., Engström G., Gudmundsdotter L., Hansson-Pilainen E., Isaguliantis M., Karlén K., Kjerrström A., Rollman E., Blomberg P., Ask R., Ekroth S., Eriksson L., Petz I., Reinhard K. Broad immunogenicity of a multigene, multiclade HIV-1 DNA vaccine boosted with heterologous HIV-1 recombinant modified vaccinia virus Ankara // *Journal of Infectious Diseases*. – 2008. – V. 198. – № 10. – P. 1482-1490.

138. Schief W. R., Ban Y. E. A., Stamatatos L. Challenges for structure-based HIV vaccine design // *Current Opinion in HIV and AIDS*. – 2009. – V. 4. – № 5. – P. 431-440.

139. Schulke N., Vesanen M. S., Sanders R. W., Zhu P., Lu M., Anselma D. J., Villa A. R., Parren P., Binley J. M., Roux K. H., Maddon P. J., Moore J. P., Olson W. C. Oligomeric and conformational properties of a proteolytically mature, disulfide-stabilized human immunodeficiency virus type 1 gp140 envelope glycoprotein // *Journal of Virology*. – 2002. – V. 76. – № 15. – P. 7760-7776.
140. SCOP: Structural Classification of Proteins. – 2009. – Режим доступа: <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/index.html>.
141. Scott J. K., Loganathan D., Easley R. B., Gong X. F., Goldstein I. J. A family of concanavalin A-binding peptides from a hexapeptide epitope library // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1992. – V. 89. – № 12. – P. 5398-5402.
142. 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.
143. Shcherbakova N. S., Shcherbakov D. N., Bakulina A. Y., Karpenko L. I., Ryzhikov A. B., Ilyichev A. A. Artificial polyepitope HIV-1 immunogen containing mimotope of 2F5 epitope // *Protein and Peptide Letters*. – 2016. – V. 23. – № 2. – P. 159-168.
144. Simek M. D., Rida W., Priddy F. H., Pung P., Carrow E., Laufer D. S., Lehrman J. K., Boaz M., Tarragona-Fiol T., Miiro G., Birungi J., Pozniak A., McPhee D. A., Manigart O., Karita E., Inwoley A., Jaoko W., DeHovitz J., Bekker L. G., Pitisuttithum P., Paris R., Walker L. M., Poignard P., Wrin T., Fast P. E., Burton D. R., Koff W. C. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Elite Neutralizers: Individuals with Broad and Potent Neutralizing Activity Identified by Using a High-Throughput Neutralization Assay together with an Analytical Selection Algorithm // *Journal of Virology*. – 2009. – V. 83. – № 14. – P. 7337-7348.
145. Stamatatos L., Lim M., Cheng-Mayer C. Generation and structural analysis of soluble oligomeric gp140 envelope proteins derived from neutralization-resistant and neutralization-susceptible primary HIV type 1 isolates // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2000. – V. 16. – № 10. – P. 981-994.

146. Stephenson K. E., D'Couto H. T., Barouch D. H. New concepts in HIV-1 vaccine development // *Current Opinion in Immunology*. – 2016. – V. 41. – P. 39-46.
147. Sun Z. W., Zhu Y., Wang Q., Ye L., Dai Y. Y., Su S., Yu F., Ying T. L., Yang C. L., Jiang S. B., Lu L. An immunogen containing four tandem 10E8 epitope repeats with exposed key residues induces antibodies that neutralize HIV-1 and activates an ADCC reporter gene // *Emerging Microbes & Infections*. – 2016. – V. 5.
148. Tumanova O., Kuvshinov V. N., Orlovskaya I. A., Proniaeva T. R., Pokrovskii A. G., Il'ichev A. A., Sandakhchiev L. S. [Immunogenetic properties of peptides mimicking a human immunodeficiency virus gp41 (HIV-1) epitope recognized by virus-neutralizing antibody 2F5] // *Molecular Biology*. – 2003. – V. 37. – № 3. – P. 556-560.
149. Tumanova O. Y., Kuvshinov V. N., Il'ichev A. A., Nekrasov B. G., Ivanisenko V. A., Kozlov A. P., Sandakhchiev L. S. Localization of the HIV-1 gp120 conformational epitope recognized by virus-neutralizing monoclonal antibodies 2G12 // *Molecular Biology*. – 2002. – V. 36. – № 4. – P. 517-521.
150. Turner B. G., Summers M. F. Structural biology of HIV // *Journal of Molecular Biology*. – 1999. – V. 285. – № 1. – P. 1-32.
151. UNAIDS. – 2018. – Режим доступа: <http://www.unaids.org/ru>.
152. UniProt. – 2018. – Режим доступа: <https://www.uniprot.org>.
153. van Gils M. J., Euler Z., Schweighardt B., Wrin T., Schuitemaker H. Prevalence of cross-reactive HIV-1-neutralizing activity in HIV-1-infected patients with rapid or slow disease progression // *AIDS*. – 2009. – V. 23. – № 18. – P. 2405-2414.
154. van Gils M. J., Sanders R. W. Broadly neutralizing antibodies against HIV-1: Templates for a vaccine // *Virology*. – 2013. – V. 435. – № 1. – P. 46-56.
155. van Gils M. J., Sanders R. W. In vivo protection by broadly neutralizing HIV antibodies // *Trends in Microbiology*. – 2014. – V. 22. – № 10. – P. 550-551.
156. VanCott T. C., Veit S. C. D., Kalyanaraman V., Earl P., Birx D. L. Characterization of a soluble, oligomeric HIV-1 gp160 protein as a potential immunogen // *Journal of Immunological Methods*. – 1995. – V. 183. – № 1. – P. 103-117.

157. Webb N. E., Montefiori D. C., Lee B. Dose-response curve slope helps predict therapeutic potency and breadth of HIV broadly neutralizing antibodies // *Nature Communications*. – 2015. – V. 6.

158. Wei X. P., Decker J. M., Liu H. M., Zhang Z., Arani R. B., Kilby J. M., Saag M. S., Wu X. Y., Shaw G. M., Kappes J. C. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2002. – V. 46. – № 6. – P. 1896-1905.

159. Wei X. P., Decker J. M., Wang S. Y., Hui H. X., Kappes J. C., Wu X. Y., Salazar-Gonzalez J. F., Salazar M. G., Kilby J. M., Saag M. S., Komarova N. L., Nowak M. A., Hahn B. H., Kwong P. D., Shaw G. M. Antibody neutralization and escape by HIV-1 // *Nature*. – 2003. – V. 422. – № 6929. – P. 307-312.

160. Wieczorek L., Krebs S. J., Kalyanaraman V., Whitney S., Tovanabutra S., Moscoso C. G., Sanders-Buell E., Williams C., Slike B., Molnar S., Dussupt V., Alam S. M., Chenine A. L., Tong T., Hill E. L., Liao H. X., Hoelscher M., Maboko L., Zolla-Pazner S., Haynes B. F., Pensiero M., McCutchan F., Malek-Salehi S., Cheng R. H., Robb M. L., VanCott T., Michael N. L., Marovich M. A., Alving C. R., Matyas G. R., Rao M., Polonis V. R. Comparable Antigenicity and Immunogenicity of Oligomeric Forms of a Novel, Acute HIV-1 Subtype C gp145 Envelope for Use in Preclinical and Clinical Vaccine Research // *Journal of Virology*. – 2015. – V. 89. – № 15. – P. 7478-7493.

161. Wu X., Kong X.-P. Antigenic landscape of the HIV-1 envelope and new immunological concepts defined by HIV-1 broadly neutralizing antibodies // *Current Opinion in Immunology*. – 2016. – V. 42. – P. 56-64.

162. Wu X. L., Parast A. B., Richardson B. A., Nduati R., John-Stewart G., Mbori-Ngacha D., Rainwater S. M. J., Overbaugh J. Neutralization escape variants of human immunodeficiency virus type 1 are transmitted from mother to infant // *Journal of Virology*. – 2006. – V. 80. – № 2. – P. 835-844.

163. Xu K., Acharya P., Kong R., Cheng C., Chuang G. Y., Liu K., Louder M. K., O'Dell S., Rawi R., Sastry M., Shen C. H., Zhang B. S., Zhou T. Q., Asokan M.,

Bailer R. T., Chambers M., Chen X. J., Choi C. W., Dandey V. P., Doria-Rose N. A., Druz A., Eng E. T., Farney S. K., Foulds K. E., Geng H., Georgiev I. S., Gorman J., Hill K. R., Jafari A. J., Kwon Y. D., Lai Y. T., Lemmin T., McKee K., Ohr T. Y., Ou L., Peng D. J., Rowshan A. P., Sheng Z. Z., Todd J. P., Tsybovsky Y., Viox E. G., Wang Y. R., Wei H., Yang Y. P., Zhou A. F., Chen R., Yang L., Scorpio D. G., McDermott A. B., Shapiro L., Carragher B., Potter C. S., Mascola J. R., Kwong P. D. Epitope-based vaccine design yields fusion peptide-directed antibodies that neutralize diverse strains of HIV-1 // *Nature Medicine*. – 2018. – V. 24. – № 6. – P. 857-867.

164. Yang X. Z., Farzan M., Wyatt R., Sodroski J. Characterization of stable, soluble trimers containing complete ectodomains of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins // *Journal of Virology*. – 2000. – V. 74. – № 12. – P. 5716-5725.

165. Zhu P., Liu J., Bess J., Chertova E., Lifson J. D., Grise H., Ofek G. A., Taylor K. A., Roux K. H. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes // *Nature*. – 2006. – V. 441. – № 7095. – P. 847-852.

166. Zhu Z., Qin H. R., Chen W., Zhao Q., Shen X., Schutte R., Wang Y., Ofek G., Streaker E., Prabakaran P., Fouda G. G., Liao H. X., Owens J., Louder M., Yang Y., Klaric K. A., Moody M. A., Mascola J. R., Scott J. K., Kwong P. D., Montefiori D., Haynes B. F., Dimitrov G. D. T. Cross-reactive hiv-1-neutralizing human monoclonal antibodies identified from a patient with 2f5-like antibody // *Journal of Virology*. – 2011. – V. 85. – № 21. – P. 11401-11408.

167. Zwick M. B., Labrijn A. F., Wang M., Spenlehauer C., Saphire E. O., Binley J. M., Moore J. P., Stiegler G., Katinger H., Burton D. R., Parren P. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41 // *Journal of Virology*. – 2001. – V. 75. – № 22. – P. 10892-10905.



**Результаты моделирования пространственной структуры белка MPER-TBI
с помощью программы I-TASSER
(I-TASSER results for job id S418166)**

Your job with job id S418166 has been completed on the I-TASSER server. The picture of the predicted models is attached with this mail. The complete results including coordinate files of the models as well as function predictions are available at:
<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/output/S418166/> The results will be kept on the server for 2 months.

(Click on [S418166_results.tar.bz2](#) to download the tarball file including all modeling results listed on this page. Click on [Annotation of I-TASSER Output](#) to read the instructions for how to interpret the results on this page. Model results are kept on the server for 60 days, there is no way to retrieve the modeling data older than 2 months)

Аминокислотная последовательность анализируемого белка в формате FASTA:

>protein

```
MTDVTIKGSTHGIELLELDKWASLANWFIITNLLWLIKTMHEDIISLWDQSLKPGIQRGP  
GRAFGSKQIINMWQEVGKAMYAPGAPEGIEEEGGGERDRGSDRVIEVVQGAYRAIRGTEIA  
LLLLDAWASLWNWFDITNWLWYIGSGLEVEHHHHHH
```


Предсказанная вторичная структура белка MPER-TBI:

[illegible]

Предсказание доступности участков молекулы для растворителя

	120	20	140	40	60	80	100
Sequence	MTDVTIKGSTHGIELLELDK WASLANWFIITNLLWLIKTMHEDIISLWDQSLKPGIQRGPGRAFGSKQIINMWQEVGKAMYAPGAPEGIEEEGGERDRGSDRVIEWVQ Q GAYRAIRGTEIALLLLD AWASLWNWFDITNWLWYIGSGLEVEHHHHHH						
Prediction	86645444452443324023204322323133003103022023132221332312120033225634102214143433244633243634644364246212410 4402432363144024244121002223133001212110000124358						
	Values range from 0 (buried residue) to 9 (highly exposed residue)						

[illegible]

9	<u>4tv</u> <u>pB</u>	0.1	0.1	0.	1.7	<u>Downl</u> <u>oad</u>	LGAA---GSTMGAASMTLTVQARNL----- LSGTVWGIKQLQARVLAVERYLRDQQLGIWGC SGK LICCTNVPWNSSWWDKEISNYTQIIYGLLEESQNQQEKNEQDLLALD----- -----
10	<u>5xn</u> <u>IA</u>	0.1	0.2	0.	0.9	<u>Downl</u> <u>oad</u>	LGKDP AFLK WYREAE LIHGRWAMA AVLGIFV GQAWSFGTLLGTQLILMGWVESKRWVDFNPD SQSVEWATPWSKTAENFVNSTGEQGYPGG KFFDPAGTIENGVIYIPDTDKLERLKLAEIKH-----ARLAMLAMLIIFYEAGQGKTPLG

- (a) All the residues are colored in black; however, those residues in template which are identical to the residue in the query sequence are highlighted in color. Coloring scheme is based on the property of amino acids, where polar are brightly coloured while non-polar residues are colored in dark shade. ([more about the colors used](#))
- (b) Rank of templates represents the top ten threading templates used by I-TASSER.
- (c) Ident1 is the percentage sequence identity of the templates in the threading aligned region with the query sequence.
- (d) Ident2 is the percentage sequence identity of the whole template chains with query sequence.
- (e) Cov represents the coverage of the threading alignment and is equal to the number of aligned residues divided by the length of query protein.
- (f) Norm. Z-score is the normalized Z-score of the threading alignments. Alignment with a Normalized Z-score >1 mean a good alignment and vice versa.
- (g) Download Align. provides the 3D structure of the aligned regions of the threading templates.
- (h) The top 10 alignments reported above (in order of their ranking) are from the following threading programs:

1: MUSTER 2: FFAS-3D 3: SPARKS-X 4: HHSEARCH2 5: HHSEARCH I 6: Neff-PPAS 7: HHSEARCH 8: pGenTHREADER 9: wdPPAS 10: PROSPECT2

5 лучших моделей белка MPER-TBI, предсказанных I-TASSER

(For each target, I-TASSER simulations generate a large ensemble of structural conformations, called decoys. To select the final models, I-TASSER uses the SPICKER program to cluster all the decoys based on the pair-wise structure similarity, and reports up to five models which corresponds to the five largest structure clusters. The confidence of each model is quantitatively measured by C-score that is calculated based on the significance of threading template alignments and the convergence parameters of the structure assembly simulations. C-score is typically in the range of [-5, 2], where a C-score of a higher value signifies a model with a higher confidence and vice-versa. TM-score and RMSD are estimated based on C-score and protein length following the correlation observed between these qualities. Since the top 5 models are ranked by the cluster size, it is possible that the lower-rank models have a higher C-score in rare cases. Although the first model has a better quality in most cases, it is also possible that the lower-rank models have a better quality than the higher-rank models as seen in our benchmark tests. If the I-TASSER simulations converge, it is possible to have less than 5 clusters generated; this is usually an indication that the models have a good quality because of the converged simulations.)

- [More about C-score](#)
- [Local structure accuracy profile of the top five models](#)

(By right-click on the images, you can export image file or change the configurations, e.g. modifying the background color or stopping the spin of your models)



☐ Spin On/Off

[Download Model 1](#)

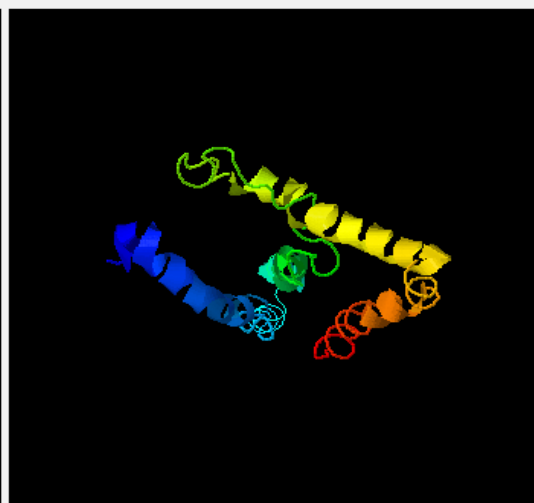
C-score=-1.60 ([Read more about C-score](#))

Estimated TM-score = 0.52 ± 0.15

Estimated RMSD = $8.3 \pm 4.5 \text{ \AA}$

☐ Spin On/Off

- [Download Model 1](#)
- C-score=-1.60 ([Read more about C-score](#))
- Estimated TM-score = 0.52 ± 0.15
- Estimated RMSD = $8.3 \pm 4.5 \text{ \AA}$



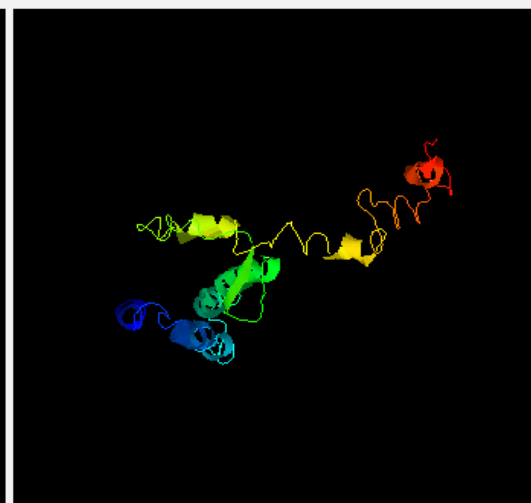
☐ Spin On/Off

• [Download Model 2](#)

• C-score = -2.85

☐ Spin On/Off

- [Download Model 2](#)
- C-score = -2.85



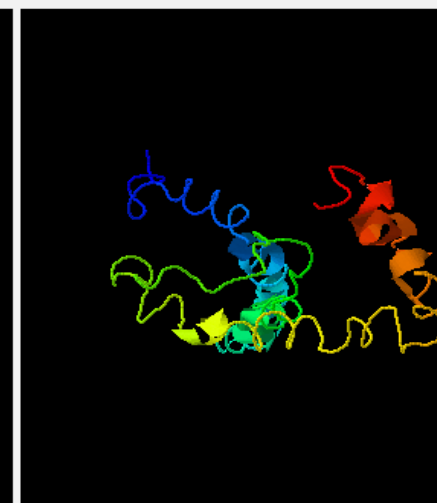
☐ Spin On/Off

• [Download Model 3](#)

• C-score = -3.58

☐ Spin On/Off

- [Download Model 3](#)
- C-score = -3.58



☐ Spin On/Off

• [Download Model 4](#)

• C-score = -3.48

☐ Spin On/Off

- [Download Model 4](#)
- C-score = -3.48

**Результаты моделирования пространственной структуры белка YkuJ-MPER
с помощью программы I-TASSER
I-TASSER results for job id S419479**

Your job with job id S419479 has been completed on the I-TASSER server. The picture of the predicted models is attached with this mail.

The complete results including coordinate files of the models as well as function predictions are available at:

<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/output/S419479/>

The results will be kept on the server for 2 months.

(Click on [S419479_results.tar.bz2](#) to download the tarball file including all modeling results listed on this page. Click on [Annotation of I-TASSER Output](#) to read the instructions for how to interpret the results on this page. Model results are kept on the server for 60 days, there is no way to retrieve the modeling data older than 2 months)

S Аминокислотная последовательность анализируемого белка в формате FASTA:

>protein

```
MELLELDKWASLANWFIIITNLLWLIKTAEEAANPEPMQRYFEVNGEKICSVKYFEKNQTFEL  
TVFQAGEKPNTPFDNIDMVSIEIALLLLDASLWNWFDITNWLWYIGSGLEHHHHHH
```

Предсказанная вторичная структура белка YkuJ-MPER:

	20	40	60	80	100
Sequence	MELLELDKWSLANWFIITNLLWLIKTAEAAANEPMQRYFEVNGEKICSVKYFEKNQTFELTVFQAGEKPNTYPFDNIDMVSIEIALLLLLDAWASLWNWFDITNL WYIGSGLEHHHHHHH				
Predicti on	CCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCSSSSSSSSSCCCCCCCCCHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCHHHH HHHSCCCCCCCCCC				
Conf.Sco re	92577779999999999999999979999999999999972788757882011445787110234432013201489999999799999888898775470313747 66211111144579				
	H:Helix; S:Strand; C:Coil				

Предсказание доступности участков молекулы для растворителя

	20	40	60	80	100
Sequence	MELLELDKWASLANWFIITNLLWLIKTAEEANEPMQRYFEVNGEKICSVKYFEKNQTFELTVFQAGEKPNTYPFDNIDMVSIEIALLLLDASLWNWFDITNWL WYIGSGLEHHHHHH				
Prediction	653262423114033221401031033042332314322404333202132334444241211316542542453124335344302303412321222323302 01020014334658				
	Values range from 0 (buried residue) to 9 (highly exposed residue)				

(I-TASSER modeling starts from the structure templates identified by LOMETS from the PDB library. LOMETS is a meta-server threading approach containing multiple threading programs, where each threading program can generate tens of thousands of template alignments. I-TASSER only uses the templates of the highest significance in the threading alignments, the significance of which are measured by the Z-score, i.e. the difference between the raw and average scores in the unit of standard deviation. The templates in this section are the 10 best templates selected from the LOMETS threading programs. Usually, one template of the highest Z-score is selected from each threading program, where the threading programs are sorted by the average performance in the large-scale benchmark test experiments.)

[illegible]

<u>n</u>	3	0	9	<u>ad</u>	RAPEAQQHLLKLTWVGIKQLQARVLAVERYLRCSGKLICTTNVPWNSSWSNMTWLQWDKEISNYTQIIYGLLEEEQDLLALD-----	
8	<u>2ffg</u> <u>A</u>	0.6 6	0.5 6	0.6 1	0.84 <u>Download</u> <u>ad</u>	----- SQLMGIITRLQSLQETAEAAANEPNGEKICSVKYFEKNQTFELTVFQKGEKPNTYFPDNIDMVSIEIFELLQLE----- -----
9	<u>4tvp</u> <u>B</u>	0.2 3	0.1 9	0.7 4	2.13 <u>Download</u> <u>ad</u>	MGAASMTL-TVQARN- LLSGTVWGIKQLQARVLAVERYWGCSGKLICCTNVSWSNRNLNMTWLQWDKEISNYTQIIYGLEKNEQDLLALD----- -----
10	<u>4r6l</u> <u>A</u>	0.0 9	0.1 4	0.9 8	1.71 <u>Download</u> <u>ad</u>	GIEQKQNLQRQIEAQQHLLQLTVSKIKQLQARILAVERYLKQQDKLYREVALQLQKIESEHQQAIEIERELNNQEIQEIGQRQNNLKRAI EAQKHLLQLTVWGIKQLQARILAVERY--LKD

(a) All the residues are colored in black; however, those residues in template which are identical to the residue in the query sequence are highlighted in color. Coloring scheme is based on the property of amino acids, where polar are brightly coloured while non-polar residues are colored in dark shade. ([more about the colors used](#))

(b) Rank of templates represents the top ten threading templates used by I-TASSER.

(c) Ident1 is the percentage sequence identity of the templates in the threading aligned region with the query sequence.

(d) Ident2 is the percentage sequence identity of the whole template chains with query sequence.

(e) Cov represents the coverage of the threading alignment and is equal to the number of aligned residues divided by the length of query protein.

(f) Norm. Z-score is the normalized Z-score of the threading alignments. Alignment with a Normalized Z-score >1 mean a good alignment and vice versa.

(g) Download Align. provides the 3D structure of the aligned regions of the threading templates.

(h) The top 10 alignments reported above (in order of their ranking) are from the following threading programs:

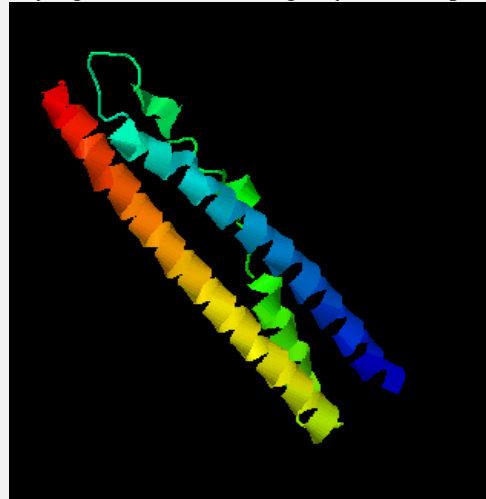
1: MUSTER 2: FFAS-3D 3: SPARKS-X 4: HHSEARCH2 5: HHSEARCH I 6: Neff-PPAS 7: HHSEARCH 8: pGenTHREADER 9: wdPPAS 10: PROSPECT2

5 лучших моделей белка YkuJ-MPER, предсказанных I-TASSER

(For each target, I-TASSER simulations generate a large ensemble of structural conformations, called decoys. To select the final models, I-TASSER uses the SPICKER program to cluster all the decoys based on the pair-wise structure similarity, and reports up to five models which corresponds to the five largest structure clusters. The confidence of each model is quantitatively measured by C-score that is calculated based on the significance of threading template alignments and the convergence parameters of the structure assembly simulations. C-score is typically in the range of [-5, 2], where a C-score of a higher value signifies a model with a higher confidence and vice-versa. TM-score and RMSD are estimated based on C-score and protein length following the correlation observed between these qualities. Since the top 5 models are ranked by the cluster size, it is possible that the lower-rank models have a higher C-score in rare cases. Although the first model has a better quality in most cases, it is also possible that the lower-rank models have a better quality than the higher-rank models as seen in our benchmark tests. If the I-TASSER simulations converge, it is possible to have less than 5 clusters generated; this is usually an indication that the models have a good quality because of the converged simulations.)

- [More about C-score](#)
- [Local structure accuracy profile of the top five models](#)

(By right-click on the images, you can export image file or change the configurations, e.g. modifying the background color or stopping the spin of your models)



[Reset to initial orientation](#) ☐ Spin On/Off

[Download Model 1](#)

C-score=-0.30 ([Read more about C-score](#))

Estimated TM-score = 0.67 ± 0.12

Estimated RMSD = $4.9 \pm 3.2 \text{ \AA}$

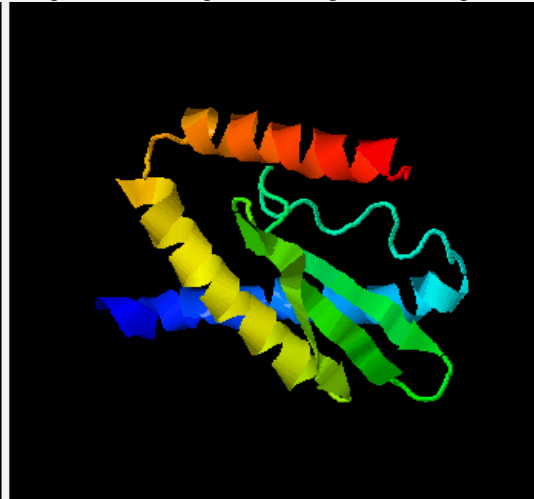
☐ Spin On/Off

• [Download Model 1](#)

• C-score=-0.30 ([Read more about C-score](#))

• Estimated TM-score = 0.67 ± 0.12

• Estimated RMSD = $4.9 \pm 3.2 \text{ \AA}$



[Reset to initial orientation](#) ☐ Spin On/Off

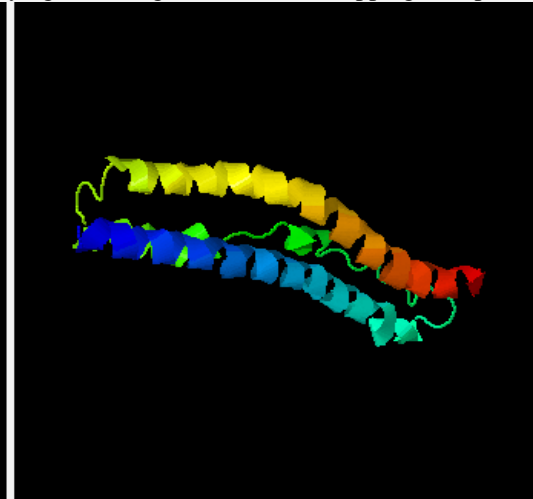
• [Download Model 2](#)

• C-score = -3.14

☐ Spin On/Off

• [Download Model 2](#)

• C-score = -3.14



[Reset to initial orientation](#) ☐ Spin On/Off

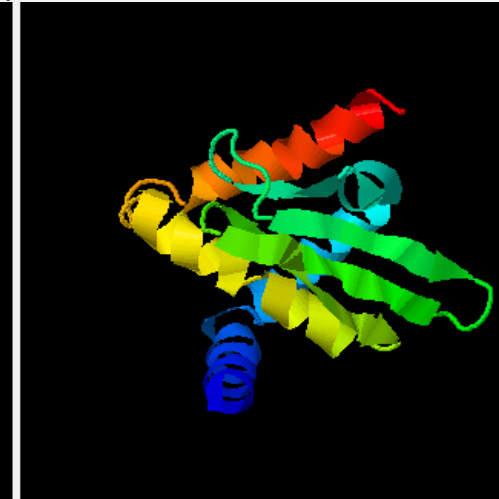
• [Download Model 3](#)

• C-score = -3.60

☐ Spin On/Off

• [Download Model 3](#)

• C-score = -3.60



[Reset to initial orientation](#) ☐ Spin On/Off

• [Download Model 4](#)

• C-score = -3.82

☐ Spin On/Off

• [Download Model 4](#)

• C-score = -3.82