на правах рукописи

ЩЕРБАКОВА

Надежда Сергеевна

КОНСТРУИРОВАНИЕ В-КЛЕТОЧНЫХ ИММУНОГЕНОВ ПРОТИВ ВИЧ-1 И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СПОСОБНОСТИ ИНДУЦИРОВАТЬ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ АНТИТЕЛА

03.01.03 - молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Кольцово – 2017

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: Карпенко Лариса Ивановна, доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией рекомбинантных вакцин ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные оппоненты: Коваленко Сергей Петрович, доктор биологических наук, доцент, руководитель лаборатории генно-инженерных методов исследования ФГБНУ «НИИ молекулярной биологии и биофизики»

Шаповал Андрей Иванович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Российско-Американского противоракового центра ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России

Защита состоится « 6 » октября 2017 г. в 9-00 на заседании диссертационного совета Д 208.020.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирской области, тел. 8 (383) 336-60-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора http://www.vector.nsc.ru

Автореферат разослан « » _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук Н.М. Зубавичене

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время в мире зарегистрировано более 36 миллионов ВИЧ-инфицированных. В России число людей с ВИЧ-инфекцией каждый год существенно увеличивается и только по официальной статистике составляет более 1 млн. Высокая опасность, которую несет ВИЧ, требует разработки новых способов профилактики и лечения этой инфекции. Современная высокоактивная антиретровирусная терапия позволяет увеличить продолжительность жизни, но не обеспечивает элиминацию патогена из организма ВИЧ-инфицированного. Поэтому создание вакцины, способной предотвратить заражение этим вирусом, является крайне необходимой мерой для остановки пандемии СПИДа.

Основная трудность в разработке вакцины против ВИЧ заключается в необычной биологии патогена: вирус размножается в клетках иммунной системы хозяина, постепенно разрушая ее; он чрезвычайно изменчив и существует в инфицированном организме в виде «квазивида» - набора вирусных вариантов, отличающихся друг от друга, что приводит к постоянному «ускользанию» вируса из-под давления иммунной системы.

Сравнительно недавно из сывороток ВИЧ-инфицированных были выделены антитела с поразительными вируснейтрализующими характеристиками, в том числе антитела 2F5 и 2G12. Некоторые из них способны нейтрализовать более 90% всех известных штаммов ВИЧ-1. Все известные антитела, обладающие нейтрализующей активностью в отношении множества различных изолятов вируса иммунодефицита, обеспечивают определенный уровень защиты от заражения на доступных моделях приматов. Возможность включения в состав рекомбинантной вакцины эпитопов, которые бы вызывали наработку подобных антител, выглядит весьма заманчиво. Считается, что создание иммуногена, способного индуцировать спектр таких антител, может обеспечить достаточную защиту против ВИЧ-1.

Однако на практике реализовать такую идею не так просто, поскольку большинство эпитопов, узнаваемых широконейтрализующими антителами, являются конформационными, структуру которых весьма сложно воспроизвести в составе искусственных иммуногенов. Решением проблемы может быть получение рекомбинантных молекул, которые содержат в своем составе имитаторы таких эпитопов в виде линейных аминокислотных последовательностей. Получить такие

имитаторы можно с помощью фаговых пептидных библиотек, путем проведения процедуры аффинной селекции с широконейтрализующими моноклональными антителами (МКА).

Весьма важной и необходимой процедурой на всех этапах разработки вакцины против ВИЧ является анализ вируснейтрализующей активности сывороток животных и человека после проведения иммунизации. На сегодняшний день одним из самых популярных методов анализа нейтрализующей активности антител, оценки антиретровирусной активности препаратов является технология псевдовирусов ВИЧ-1. Этот метод позволяет работать с вирусными частицами из множества вирусных субтипов, обеспечивать высокий уровень воспроизводимости и производительности, применять простые и безопасные реагенты.

В настоящее время существуют панели псевдовирусов разных субтипов: A, B, C, G, CRF01_AE, CRF07_BC (например, референс-панель *env*-клонов ВИЧ-1 различных субтипов, входящих в список NIH AIDS Reagent Program). Однако ни в одну существующую панель не входят *env*-псевдовирусы, полученные из изолятов, циркулирующих на территории Сибирского федерального округа.

Несомненно, что при разработке национальной вакцины для тестирования ее специфической активности необходимо использовать псевдовирусы как из международной панели, так и на основе циркулирующих на территории России субтипов ВИЧ-1.

Целью данной работы было конструирование полиэпитопных иммуногенов, содержащих пептиды-имитаторы эпитопов, узнаваемых МКА 2F5 и 2G12, и изучение их способности индуцировать наработку нейтрализующих антител.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- получить иммуногены, содержащие пептиды-имитаторы эпитопов ВИЧ-1, узнаваемых МКА 2F5 и 2G12;
- иммунизировать лабораторных животных полученными конструкциями;
- создать панель *env*-псевдовирусов;
- изучить нейтрализующую активность сывороток крови иммунизированных животных с использованием *env*-псевдовирусов.

Научная новизна и практическая ценность. В ходе исследования были получены иммуногены, несущие в своем составе пептиды-имитаторы 2F5- и 2G12-эпитопов.

Впервые получена коллекция *env*-псевдовирусов субтипов, распространенных на территории Западной Сибири.

Депонировано в международной базе данных GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) 3 полных генома ВИЧ-1 (KJ197200.1-KJ197202.1), 22 фрагмента области генов *pol* и *gag* ВИЧ-1 (KJ197203.1-KJ197224.1), 15 фрагментов гена *env* ВИЧ-1 (KJ197185.1-KJ197199.1).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Искусственный белок TBI способен служить в качестве каркаса для экспонирования пептидов-имитаторов эпитопов ВИЧ-1.

2. Пептиды-имитаторы в составе белка-носителя способны вызывать наработку нейтрализующих антител. Сыворотки крови мышей, иммунизированных рекомбинантными белками с включенными в состав пептидами-имитаторами, обладают нейтрализующей активностью в отношении *env*-псевдовирусов ВИЧ-1.

3. В состав полученной панели псевдовирусов, сконструированной на основе изолятов ВИЧ-1, циркулировавших на территории Сибирского федерального округа в 2015-2016 гг., входят 17 *env*-псевдовирусов, 15 из них относятся к рекомбинантной форме CRF63_02A1, а два – к субтипу A1. Созданную коллекцию *env*-псевдовирусов субтипов ВИЧ-1, распространенных в Сибирском Федеральном округе, можно использовать для проверки нейтрализующей активности иммуногенов против ВИЧ-1.

Апробация работы и публикации. Материалы работы были представлены на всероссийских и международных конференциях, в том числе: 5-й Конференции по патогенности, лечению и профилактике ВИЧ (г. Кейптаун, ЮАР, 2009 г); 9-й Конференции по вакцинам против СПИДа (г. Париж, Франция, 2009 г); XVIII Международной конференции по СПИДу (г. Вена, Австрия, 2010 г); 3-й и 5-й Международной Конференции по ВИЧ/СПИДу в Восточной Европе и Центральной Азии (г. Москва, Россия, 2009 г и 2016 г); II Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (п. Кольцово, Россия, 2015), по итогам которых опубликован 21 тезис.

По результатам работы опубликовано девять статей, из них пять - в журналах из списка ВАК Минобрнауки России.

Личный вклад автора. Большинство экспериментов и анализ полученных данных выполнены лично автором. Конструирование иммуногена TBI-2G12 выполнено совместно с Чикаевым А.Н. Электронные микрофотографии псевдовирусных частиц выполнены Зайцевым Б.Н., Тарановым О.С., отдел микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Секвенирование ДНК выполнено Бондарем А.А., ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН. Масс-спектрометрический анализ подготовленных образцов белков выполнен Дужак Т.Г., Институт цитологии и генетики СО РАН. Оценка вируснейтрализующей активности сывороток иммунизированных животных с использованием *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 субтипа В проводилась Шаламовой Л.А., отдел зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Молекулярный докинг пептида-имитатора 2F5 эпитопа с МКА 2F5 проводился Бакулиной А.Ю., теоретический отдел ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 150 страницах, включает 34 рисунка, 11 таблиц. Список литературы включает 308 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Рекомбинантные белки, несущие пептид-имитатор эпитопа, узнаваемого антителом 2F5

С помощью процедуры аффинной селекции с использованием фаговой пептидной библиотеки ранее была получена коллекция пептидов, которые эффективно связывались с МКА 2F5 при проведении иммуноферментного анализа (ИФА). Наиболее привлекательными характеристиками, по сравнению с остальными имитаторами, обладал пептид RDWSFDRWSLSEFWL. Одна из задач данной работы заключалась в проведении модификации белка TBI путем замены его фрагментов на эпитопы, узнаваемые широконейтрализующими антителами. Для встройки последовательности, кодирующей отобранный пептид-имитатор RDWSFDRWSLSEFWL, мы использовали плазмиду pTBI. Было проведено

клонирование олигонуклеотидов, кодирующих отобранный пептид-имитатор, в составе плазмиды pTBI, с использованием сайтов рестрикции Bsp13I и ApaI. В результате была получена плазмида pTBI-2F5, включающая нуклеотидную последовательность, кодирующую пептид-имитатор RDWSFDRWSLSEFW, вместо последовательности, кодирующей эпитоп на С-конце белка TBI.

Полученной рекомбинантной плазмидой были трансформированы клетки *E.coli* JM103. При помощи электрофореза в 12 %-ном полиакриламидном геле было показано, что трансформированные клетки продуцируют рекомбинантный белок, имеющий массу, аналогичную теоретически рассчитанной. В иммуноблоте было показано, что TBI-2F5, аналогично TBI, связывается с антителами к TBI. Это говорит о том, что общая антигенная структура белка не была нарушена. Таким образом, был получен препарат белка TBI-2F5 с чистотой, пригодной для иммунизации животных, несущий в своем составе пептид-имитатор RDWSFDRWSLSEFWL.

Для оценки иммуногенных свойств очищенным препаратом белка TBI-2F5 были иммунизированы мыши BALB/c. Группа 1 была иммунизирована белком TBI, группа 2 – белком TBI-2F5, группа 3 – физраствором (контрольная группа).

Полученные сыворотки анализировали с помощью ИФА. Сыворотки мышей, иммунизированных белком TBI-2F5, связывались с белком TBI, сорбированным на подложку, с той же эффективностью, что и сыворотки мышей группы 2. Этот факт свидетельствует о том, что замена С-концевого эпитопа пептидом RDWSFDRWSLSEFWL существенно не меняет антигенные свойства TBI.

При использовании в качестве антигена пептида RDWSFDRWSLSEFWL было показано, что в ответ на иммунизацию белком TBI-2F5 нарабатываются антитела, узнающие пептид. В то же время сыворотки животных группы 2 и 3 с пептидом в ИФА не связывались (Рисунок 1).

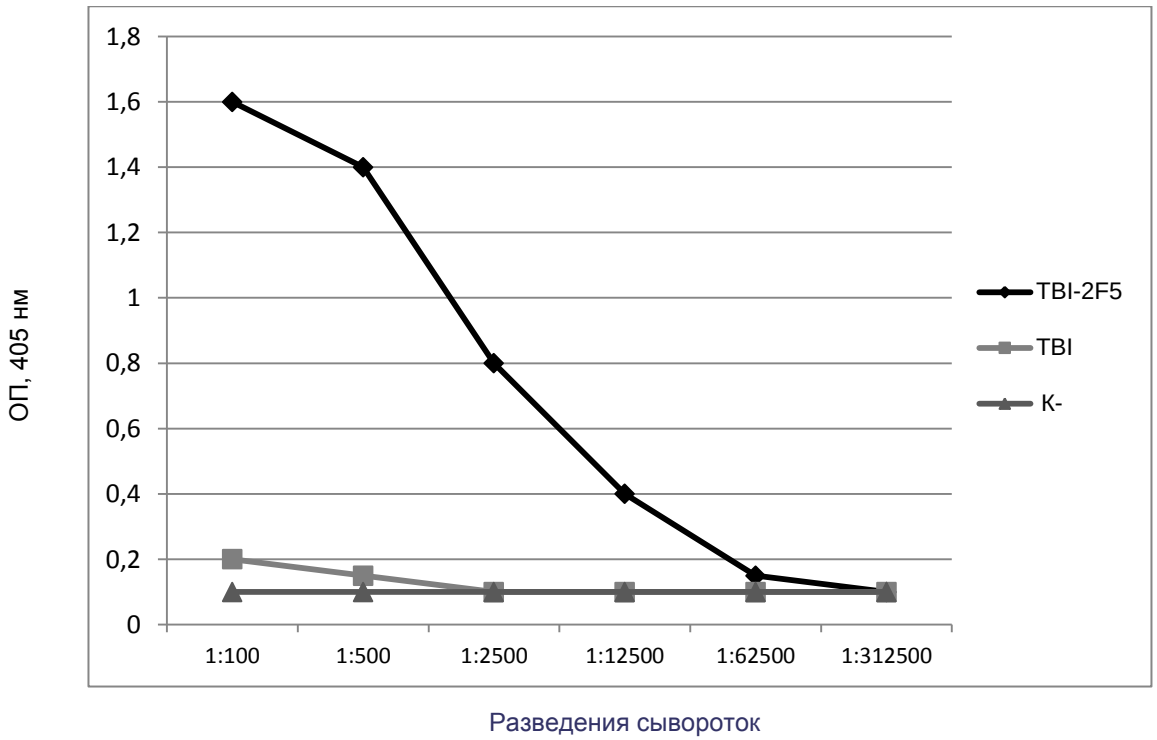

Рисунок 1. Оценка специфичности сывороток мышей, иммунизированных белками TBI-2F5, TBI и физиологическим раствором (К-). В качестве антигена сорбирован пептид RDWSFDRWSLSEFWL. Титр антител в группе TBI-2F5 составил 1:12500

Кроме того, с помощью тест-системы New-Lav-Blot1 (BioRad), в которой используются стрипы с сорбированными нативными белками ВИЧ-1, было показано, что сыворотки мышей, иммунизированных как исходным белком TBI, так и белком TBI-2F5, узнают нативные белки ВИЧ-1.

Таким образом, было показано, что в ответ на иммунизацию белком TBI-2F5 действительно нарабатываются антитела, специфически взаимодействующие с пептидом RDWSFDRWSLSEFWL - имитатором эпитопа 2F5.

Рекомбинантные белки, несущие пептид-имитатор эпитопа, узнаваемого антителом 2G12

Аналогично получению рекомбинантного белка TBI-2F5 на основе белка TBI был получен рекомбинантный белок TBI-2G12. Однако продукция химерного белка оказалась на несколько порядков ниже в сравнении с исходным белком TBI. Поэтому для увеличения продукции белка TBI-2G12 было решено перенести ген TBI-2G12 в плазмиду pET21a, содержащую сильный промотор РНК-полимеразы фага T7. Попутно была удалена избыточная последовательность длиной 20 а.о. белка recA, располагающаяся на N-конце исходного белка TBI и несущественная для индукции гуморального ответа против ВИЧ-1. С этой целью была получена ПЦР-копия гена

TBI с использованием праймеров, содержащих сайты рестрикции Nde I и Xho I. Этот фрагмент встраивали по указанным сайтам в вектор pET21a. Полученной конструкцией трансформировали клетки *E.coli* BL21.

С помощью иммуноблота с антисывороткой против RecA TBI было показано, что индуцированные изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) трансформированные клетки содержат целевые белки, молекулярная масса которых соответствовала расчетной (Рисунок 2).

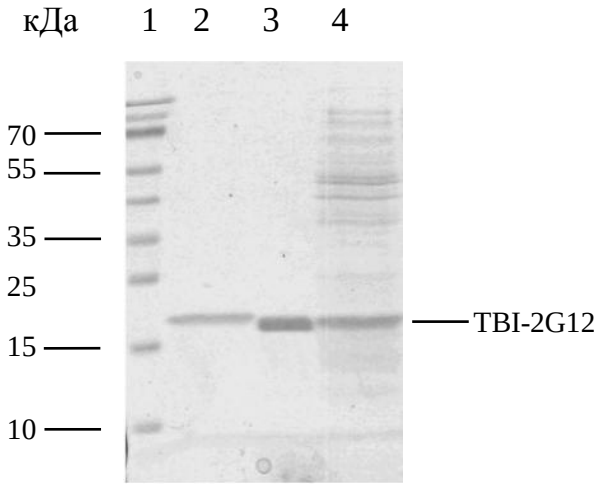

Рисунок 2. Иммуноблотинг после разделения в 12 %-ном полиакриламидном геле рекомбинантных клеток *E.coli* штамм BL21, продуцирующих TBI-2G12. Выявление с помощью сывороток мышей, специфичных к TBI, и антивидового конъюгата с щелочной фосфатазой.

1- M; 2 - лизат *E.coli*/TBI; 3 - лизат *E.coli*/TBI-2G12; 4 - лизат *E.coli*

В результате был получен электрофоретически гомогенный препарат рекомбинантного белка TBI-2G12.

Для оценки гуморального иммунного ответа проводили иммунизацию мышей линии BALB/c очищенными рекомбинантными белками TBI (группа 1), TBI-2G12 (группа 2) и физиологическим раствором (группа 3 – контроль).

Сыворотки были проверены с помощью ИФА. В первую очередь производилась оценка способности сывороток связываться с исходным белком TBI, который сорбировали в качестве антигена. Анализ показал, что сыворотки мышей, иммунизированных TBI-2G12, так же эффективно узнают TBI, как и положительный контроль (сыворотки к исходному белку TBI) (Рисунок 3).

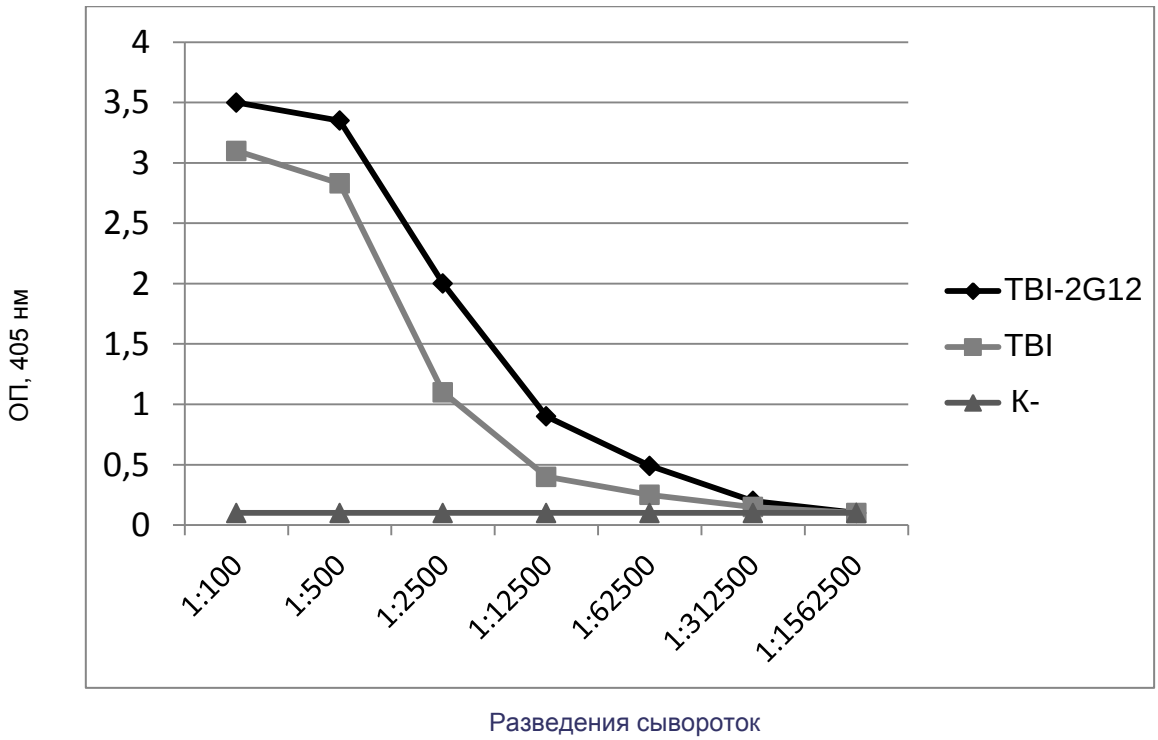

Рисунок 3. Оценка специфичности сывороток мышей, иммунизированных белками TBI-2G12, TBI и физиологическим раствором (К-). В качестве антигена сорбирован белок TBI

Далее специфичность сывороток оценивали с помощью синтетического пептида-имитатора VGAFGSFYRLSVLQS, сорбированного на ИФА планшеты. Из графика видно, что сыворотки мышей, иммунизированных TBI-2G12, узнают пептид-имитатор эпитопа, в то время как сыворотки к исходному TBI не узнают. Кроме того, специфичность антител сыворотки иммунизированных животных была показана при помощи иммуноблота (New-Lav-Blot1, Bio-Rad).

Конструирование и характеризация панели env-псевдотипированных ВИЧ-1

Важным показателем эффективности вакцины является оценка ее способности индуцировать ВИЧ-нейтрализующие антитела. В связи с этим изучение вируснейтрализующих свойств антител, индуцированных ВИЧ-1 иммуногенами, является важной процедурой при создании вакцины. На смену трудоемкому и дорогостоящему методу анализа нейтрализации ВИЧ с помощью мононуклеаров крови и вирусных изолятов пришла технология псевдотипированных вирусов. *Env*-псевдотипированная вирусная система чувствительна, воспроизводима, обладает корреляционностью, она оптимизирована и валидирована под стандарты GCLP для проведения клинических испытаний на людях, все реагенты могут быть

стандартизованы, и, наконец, метод и все реагенты можно передавать между лабораториями и воспроизводить результаты.

Для полноценного использования этого метода необходима широкая панель псевдовирусов, включающая различные субтипы ВИЧ-1. В связи с этим существенная часть работы посвящена созданию и характеризации панели псевдовирусов субтипов ВИЧ-1, актуальных для России, в частности для Западно-Сибирского региона. Такая панель необходима не только для адекватной оценки ВИЧ-иммуногенов, а именно, их способности индуцировать нейтрализующие вирус антитела, но и для скрининга разрабатываемых антиретровирусных препаратов.

Для работы использовались 65 сывороток ВИЧ-инфицированных пациентов из Новосибирского, Кемеровского и Алтайского центров СПИД.

Из сывороток была выделена мРНК ВИЧ-1 при помощи набора реагентов QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). С полученной мРНК была проведена реакция обратной транскрипции с последующим проведением гнездовой ПЦР для получения полноразмерного гена *env*.

В результате из 65 сывороток ВИЧ-инфицированных пациентов было амплифицировано 20 полноразмерных копий гена *env* (Рисунок 4).

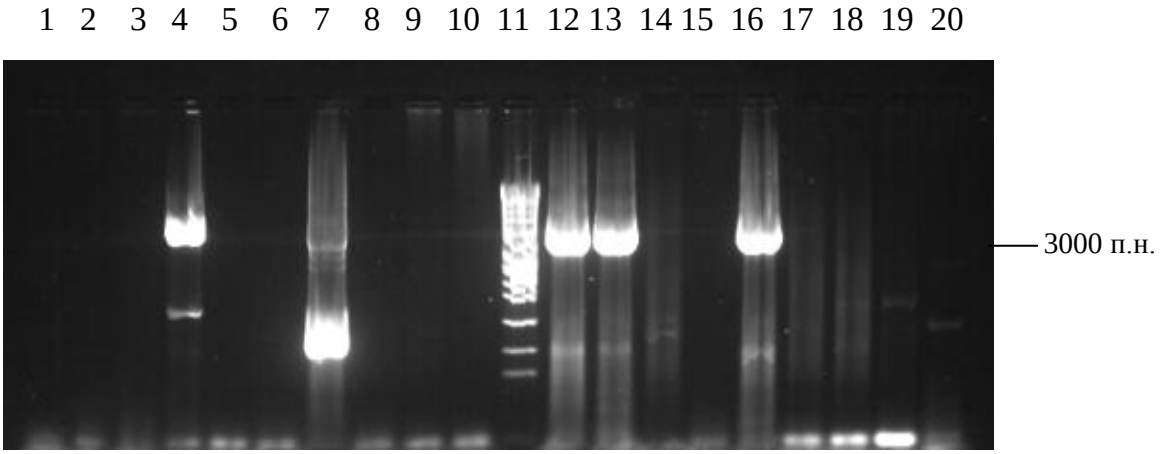

Рисунок 4. Электрофореграмма продуктов ПЦР реакции гена *env* с праймерами 3, 4 и 7, 8. 2, 3, 5-10, 14, 15, 17-20 – отрицательные образцы; 4, 12, 13, 16 – положительные образцы, 1 – отрицательный контроль, 11 – маркер молекулярного веса

Для дальнейшего клонирования полноразмерного гена *env* была проведена амплификация одиночного генома (SGA) образцов с праймерами, использованными при амплификации гена *env*.

Полученные таким образом фрагменты гена *env* были клонированы в составе челночного вектора pcDNA 3.1. После проведения лигирования была проведена трансформация клеток *E.coli* Stbl2 лигазной смесью. Положительные клоны в правильной ориентации отбирались при помощи ПЦР на ген *env* с различными парами праймеров. Все колонии, несущие вставку, нарабатывали в среде LB при 30° С в течение ночи, плазмидную ДНК выделяли и очищали при помощи набора реагентов QIAGEN MiniPrep Kit. Наличие *env*-вставки в плазмидах на данном этапе и в последующем подтверждали ПЦР с праймерами на ген *env*.

Плазмиды, несущие вставку гена *env*, использовали для получения *env*-псевдовирусов ВИЧ-1. *Env*-псевдовирусы получали магнитной котрансфекцией клеток 293T/17 двумя видами плазмид в эквимолярных концентрациях. Одна из плазмид – pSG3ΔEnv – кодирует все гены ВИЧ-1, за исключением оболочечных белков, она используется для получения всех псевдовирусов, вторая плазмида – pEnv – кодирует оболочечные белки ВИЧ-1, соответственно клонированным генам *env*. В результате котрансфекции клеток 293T/17 были получены 98 клонов 20 псевдовирусов.

Сборку и выход псевдовирусных частиц подтверждали методом электронной микроскопии (Рисунок 5).

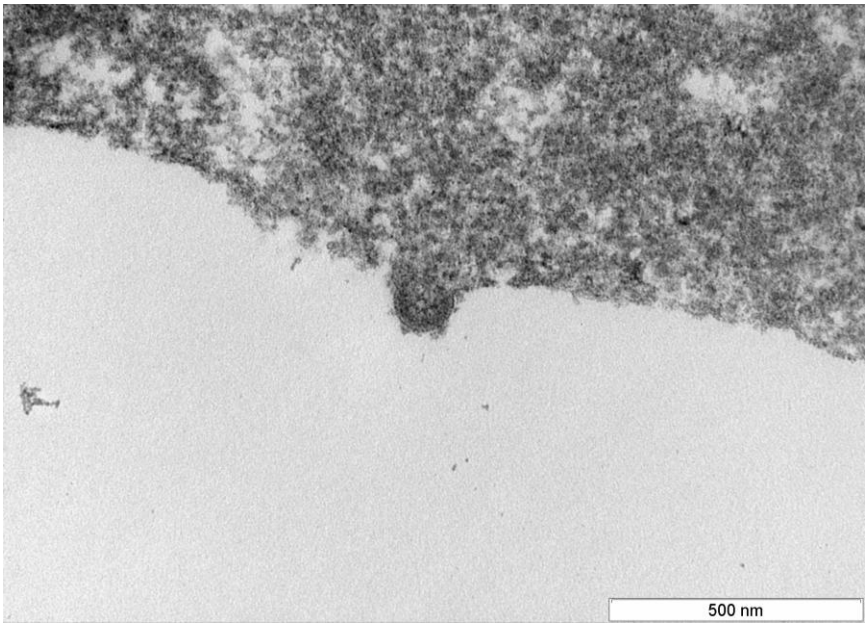

Рисунок 5. Электронная фотография клеток 293T с отпочковывающимся от них псевдовирусом Nov_2

Далее определяли функциональность клонов, т.е. способность заражать чувствительные клетки TZM-bl. В качестве функциональных отбирали по одному клону каждого псевдовируса, показывающего превышение сигнала люминесценции над контролем (клетки TZM-bl, не зараженные псевдовирусом) в 50 раз и более. В результате было получено 17 функциональных псевдовирусов ВИЧ-1 от разных доноров.

Полученные псевдовирусы титровали и определяли 50 %-ную тканеинфицирующую дозу (TCID50) для использования в дальнейшей работе.

Определение субтипа генов env, использованных при получении псевдовирусов ВИЧ-1

Для того чтобы определить субтип полученных нами псевдовирусов, было построено филогенетическое дерево. В качестве референсных брали все известные субтипы и рекомбинантные формы. На рис. 6 представлены фрагменты филогенетических деревьев последовательностей гена *env* по данным секвенирования ампликонов.

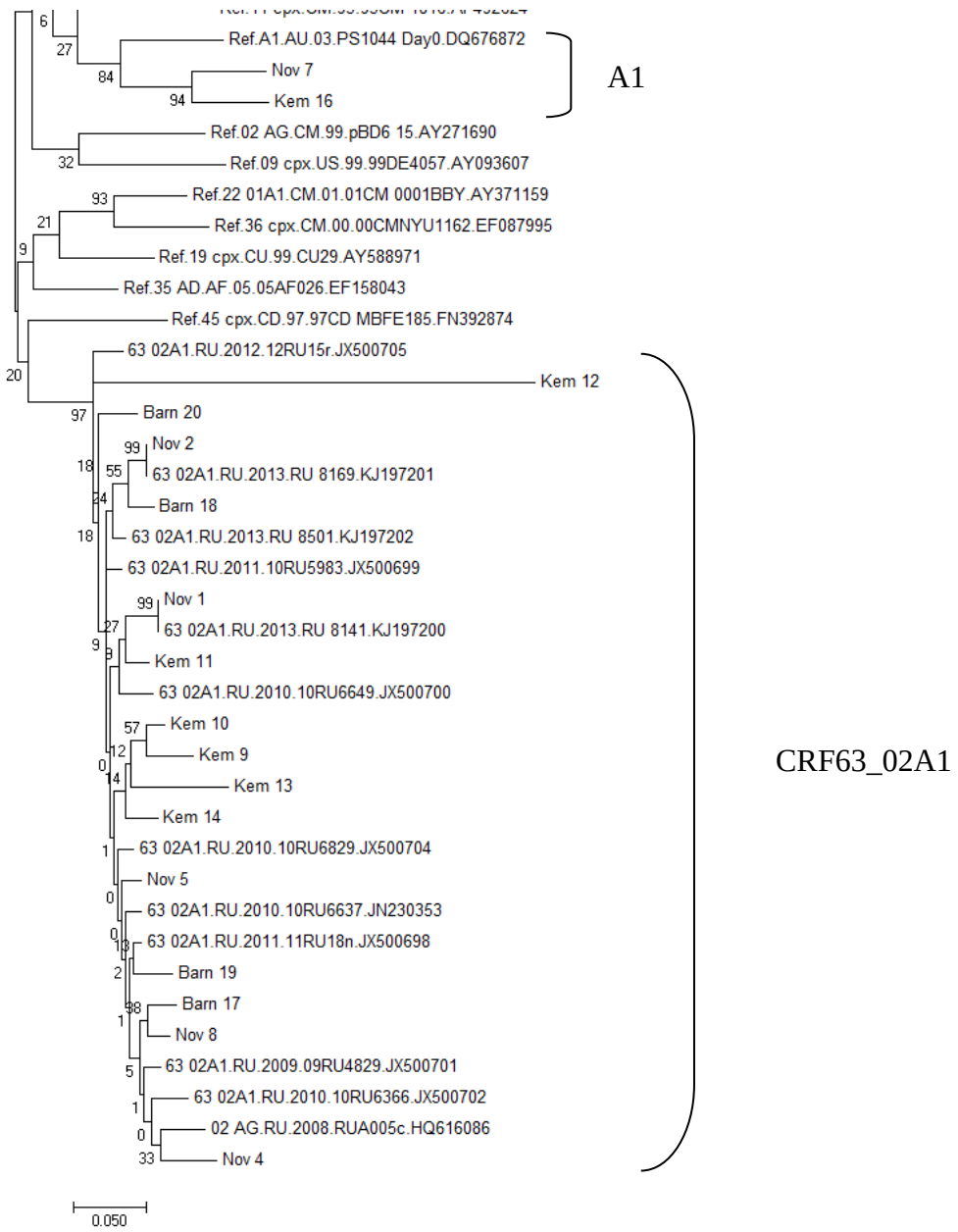

Рисунок 6. Фрагмент филогенетического дерева генов *env*, построенного методом максимального правдоподобия при помощи программы MEGA7

Кроме этого, был проведен анализ рекомбинации гена *env* при помощи программ Genotyping и SimPlot и определен субтип вирусов при помощи программы HIV Blast.

Таким образом, филогенетический и рекомбинационный анализы показали, что практически все проанализированные последовательности относятся к рекомбинантной форме CRF63_02A1. Две последовательности, Nov_7 и Kem_16, относятся к субтипу A1 (Таблица 1).

Таблица 1

Характеристика полученных псевдовирусов

№ п/п	Псевдо-вирус	Город	субтип гена *env*	Ко-рецеп-тор	Полный геном, субтип	Ста-дия инфек-ции	Способ переда-чи
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
1.	Nov_1	Новосибирск	CRF63_02A1	CCR5	CRF63_02A1	Острая	половой
2.	Nov_2	Новосибирск	CRF63_02A1	R5/X4	CRF63_02A1	Острая	половой
3.	Nov_4	Новосибирск	CRF63_02A1	CCR5		Острая	половой
4.	Nov_5	Новосибирск	CRF63_02A1	CCR5		Острая	половой
5.	Nov_7	Новосибирск	A1	CCR5		Острая	половой
6.	Nov_8	Новосибирск	CRF63_02A1	CCR5		Острая	ПИН
7.	Kem_9	Кемерово	CRF63_02A1	CCR5	CRF63_02A1	Н.д.	ПИН
8.	Kem_10	Кемерово	CRF63_02A1	CCR5		Н.д.	ПИН
9.	Kem_11	Кемерово	CRF63_02A1	CCR5	CRF63_02A1	Н.д.	половой
10.	Kem_12	Кемерово	CRF63_02A1	CCR5		Н.д.	ПИН
11.	Kem_13	Кемерово	CRF63_02A1	CCR5		Н.д.	ПИН
12.	Kem_14	Кемерово	CRF63_02A1	CCR5		Н.д.	половой
13.	Kem_16	Кемерово	A1	CCR5	A1	Н.д.	половой
14.	Barn_17	Барнаул	CRF63_02A1	CCR5	CRF63_02A1	Н.д.	Н.д.
15.	Barn_18	Барнаул	CRF63_02A1	CCR5		Н.д.	Н.д.
16.	Barn_19	Барнаул	CRF63_02A1	CCR5		Н.д.	Н.д.
17.	Barn_20	Барнаул	CRF63_02A1	CCR5	CRF63_02A1	Н.д.	Н.д.

Кроме этого, были амплифицированы и секвенированы нуклеотидные последовательности, кодирующие полные геномы семи вирусов. Филогенетический анализ показал, что шесть из них относятся к рекомбинантной форме CRF63_02A1, один – к субтипу A1 (Рисунок 7).

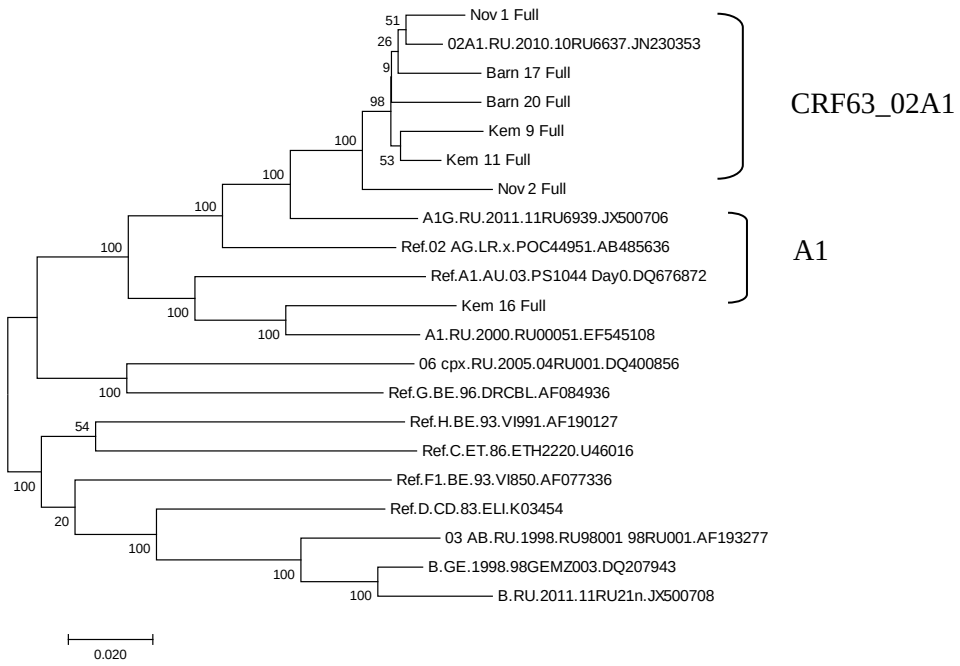

Рисунок 7. Фрагмент филогенетического дерева почти полных геномов, построенного методом максимального правдоподобия при помощи программы MEGA7

Для определения тропизма полученных *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 использовали генотипический и фенотипический методы. Генотипический метод основан на определении аминокислотной последовательности V3 петли, которая отвечает за тропизм ВИЧ-1. Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности V3 петель анализировали при помощи программ geno2pheno (http://coreceptor.geno2pheno.org/) и PhenoSeq (http://tools.burnet.edu.au/phenoseq/).

Кроме того, определение корецептора проводили фенотипическим методом. В качестве контроля брали два псевдовируса субтипа B: QHO692.42 и TRO.11, которые являются CCR5-тропными. Анализ проводили в клетках TZM-bl, в присутствии или отсутствии антагонистов рецептора CXCR4 (AMD3100) и рецептора CCR5 (TAK-779). Использование корецептора определяли по уменьшению сигнала люминесценции в лунках с добавлением одного или обоих антагонистов, по сравнению с контрольными лунками (клетки без какого-либо антагониста).

Подбор условий получения env-псевдовирусов

Во-первых, было подобрано соотношение плазмид pSG3ΔEnv (упаковочная плазмида) и pEnv (оболочечная плазмида) при проведении трансфекции. Исследование было проведено для четырех псевдовирусов: Nov_1, Nov_2, Kem_9 и Barn_17. В качестве контроля был взят псевдовирус субтипа B QHO692.42.

Оказалось, что максимальный выход пседовирусов наблюдается, когда соотношение плазмид pSG3ΔEnv:pEnv 2:1, при экспозиции как двое, так и трое суток.

Во-вторых, определяли оптимальную концентрацию клеток для инфицирования псевдовирусами. Работу проводили со семью псевдовирусами (Nov_1, Nov_2, Kem_9, Kem_10, Barn_17, QHO692.42, TRO.11) при концентрации каждого псевдовируса 200 TCID50/лунку и 15 мкг/мл DEAE-декстрана. Клетки раститровывали 3-кратным шагом и вносили в лунки 96-луночного культурального планшета от 14 кл/лунку до $8{,}1\times10^5$ кл/лунку. Контроль клеток (КК) культивировали так же, как и остальные, но без добавления вируса. Было определено, что оптимальная концентрация клеток при внесении ко всем псевдовирусам в нашей системе составляет 2×10^4 кл/лунку.

В-третьих, определяли оптимальную концентрацию псевдовирусов для инфицирования. К клеткам вносили разное количество псевдовирусов при одинаковой концентрации клеток 1×10^4 кл/лунку и 15 мкг/мл декстрана. В работе использовали семь псевдовирусов (Nov_1, Nov_2, Kem_9, Kem_10, Barn_17, QHO692.42, TRO.11). Количество вносимых псевдовирусов варьировалось от 1 TCID50/лунку до 20000 TCID50/лунку.

Оказалось, что при повышении числа вносимых псевдовирусов к клеткам происходит пропорциональное увеличение сигнала люминесценции. При достижении концентрации 800 TCID50/лунку значения люминесценции псевдовирусов схожи, и на уровне 800 TCID50/лунку начинается расхождение: у одних псевдовирусов значение люминесценции выше, у других ниже, при одинаковой вносимой концентрации.

Таким образом, при проведении реакций нейтрализации оптимальным является использование концентрации наших псевдовирусов от 200 до 800 TCID50/лунку.

В-четвертых, была определена оптимальная концентрация DEAE-декстрана. DEAE-декстран добавляется к клеткам TZM-bl для достижения адекватного уровня инфицирования псевдовирусами клеток. Было показано, что в небольшой концентрации DEAE-декстран не оказывает токсического действия, однако высокие дозы негативно сказываются на жизнеспособности клеток. Для оптимизации условия проведения вируснейтрализации нами был проведен экспериментальный подбор концентрации DEAE-декстрана. В лунки 96-луночного планшета вносили по 10^4

трипсинизированных клеток TZM-bl, по 200 TCID50 псевдовирусов Nov_1, Nov_2, Kem_9, Kem_10, Barn_17, TRO.11 и разное количество DEAE-декстрана: от 0 до 320 мкг/мл в трех повторах. Таким образом, было установлено, что оптимальная концентрация декстрана в наших исследованиях равна 20-35 мкг/мл трипсинизированной суспензии клеток TZM-bl.

Характеризация псевдовирусов при помощи МКА

Важной характеристикой псевдовирусов является их чувствительность к нейтрализации моноклональными антителами, нейтрализующими широкий спектр первичных изолятов ВИЧ-1. На основании этих данных псевдовирусы относят к разным категориям (уровень 1А, 1В, 2 и 3), это является решающим фактором при отборе псевдовирусов для проверки нейтрализующих свойств вакцин против ВИЧ-1.

Полученные нами псевдовирусы были использованы в реакции нейтрализации с bNabs, узнающих различные регионы ВИЧ-1: 2F5 и 4E10 к gp41, VRC01 – к CD4bs gp120, 2G12 и PG9 – к гликанам gp120. В качестве контроля были взяты псевдовирусы субтипа В: 6535.3, относящийся к уровню 1В по чувствительности к нейтрализации МКА, TRO.11 – уровень 2, pTRJO4551.58 – уровень 3 (Таблица 2).

Таблица 2

Чувствительность полученных псевдовирусов к нейтрализации МКА

Псевдовирус	IC_{50}, мкг/мл					Уро-вень
	2F5	**4E10**	**2G12**	**VRC01**	**PG9**	
Nov_1	>50	3.30 (1.24-6.40)	>50	0.29 (0.06-2.12)	1.85 (0.80-4.23)	2
Nov_2	13.62 (1.25-25.59)	2.68 (0.61-11.79)	0.57 (0.40-0.80)	0.17 (0.15-0.19)	0.09 (0.06-1.23)	1
Nov_4	3.97 (0.23-8.30)	2.36 (1.88-2.96)	1.49 (0.36-4.68)	0.27 (0.06-1.18)	0.84 (0.01-1.98)	1
Nov_5	15.18[1]	1.42 (0.84-2.40)	>50	>50	0.01 (0.01-0.02)	3
Nov_7	6.1 (2.9-12.6)	0.18 (0.1-0.3)	>50	0.1 (0.06-0.17)	0.08 (0.05-0.12)	1
Nov_8	>50	17.2 (10-30.4)	>50	0.13 (0.1-0.18)	15.2 (9.6-20.4)	3
Kem_9	12.45[1]	5.79 (4.15-8.10)	>50	1.58 (0.68-3.74)	4.8 (2.58-8.15)	2
Kem_10	5.43 (1.7-17.3)	>50	13.17 (9.1-26.4)	2.48 (1.75-3.51)	1.59 (0.44-3.71)	2
Kem_11	>50	5.09 (1.74-14.87)	>50	0.09 (0.8-0.13)	0.19 (0.12-0.34)	2
Kem_12	10.74 (6.87-16.78)	2.77 (1.10-6.97)	2.30 (1.08-4.88)	0.06 (0.05-0.07)	4.10 (2.47-6.81)	2
Kem_13	8.01 (4.34-14.32)	10.26 (8.53-14.26)	>50	2.80 (1.45-5.63)	6.70 (3.46-12.87)	2
Kem_14	>50	12.76[1]	>50	0.21 (0.16-0.28)	>50	3
Kem_16	>50	2.98 (1.60-5.58)	>50	0.07 (0.04-0.14)	0.06 (0.03-0.12)	2
Barn_17	12.91[1]	0.52 (0.45-0.60)	1.73 (1.21-2.46)	0.29 (0.23-0.36)	>50	2
Barn_18	4.45 (3.03-6.53)	0.48 (0.36-0.63)	1.42 (1.10-1.85)	0.34 (0.23-0.51)	1.05 (0.20-5.62)	1
Barn_19	3.46 (3.10-3.86)	1.16 (0.59-2.29)	>50	0.39 (0.21-0.73)	>50	2
Barn_20	31.48 (15.39-50.33)	6.82 (2.98-15.56)	17.16 (7.46-39.49)	0.33 (0.21-0.50)	0.16 (0.10-0.26)	2
6535.3	5.79 (3.58-9.36)	3.33 (0.85 -13.09)	>50	0.65 (0.52-0.82)	0.68 (0.10-1.33)	1
TRO.11	29.10 (21.71-38.99)	2.93 (1.52-5.65)	>50	2.74 (0.51-14.56)	5.74 (3.86-6.32)	2
TRJO4551.58	>50	12.3[1]	>50	0.12 (0.05-0.26)	9.15 (1.18-21.32)	3

Для каждого МКА вычисляли среднее значениЕ IC_{50} по результатам трех параллельных измерений, вычисление 95 %-ного доверительного интервала и всю обработку данных проводили при помощи программы GraphPad Prism 6.0 (http://www.graphpad.com). Символом [1] отмечены значения IC_{50}, у которых

доверительные интервалы слишком широкие. IC_{50} выражено в концентрации антител (мкг/мл), при которой происходит снижение люминесцентного сигнала на 50 %.

На основании полученных данных мы условно разделили псевдовирусы на три уровня по чувствительности к нейтрализации МКА (Таблица 2.). Как видно из таблицы, четыре псевдовируса мы отнесли к уровню 1, одиннадцать псевдовирусов – к уровню 2 и два псевдовируса – к уровню 3. Это согласуется с литературными данными, согласно которым большинство изолятов ВИЧ-1 относятся ко второму уровню чувствительности к МКА, и лишь небольшая часть – к первому и третьему.

Таким образом, были получены и охарактеризованы 15 псевдовирусов рекомбинантной формы CRF63_02A1 и два псевдовируса субтипа A1. Полученные нами плазмиды, кодирующие ген *env*, переданы в Национальный институт биологических стандартов и контроля, г. Лондон, Великобритания, в рамках европейского сотрудничества EURIPRED.

Оценка вируснейтрализующей активности иммуногенов, несущих пептиды-имитаторы широконейтрализующих антител

Финальным этапом нашей работы стало исследование вируснейтрализующей активности сывороток с помощью стандартной и полученной нами панели псевдовирусов.

Полученные после иммунизации рекомбинантными белками TBI-2F5 и TBI-2G12 сыворотки мышей были проверены на способность нейтрализовать псевдовирусы ВИЧ-1.

В работе использовались пять псевдовирусов: три полученных нами псевдовируса рекомбинантной формы CRF63_02A1 (Nov_1, Nov-2, Nov-4) и два субтипа B (QH0692.42, PVO.4).

Было определено значение разведения сывороток, обеспечивающее 50 % нейтрализации псевдовирусов (Рисунок 8).

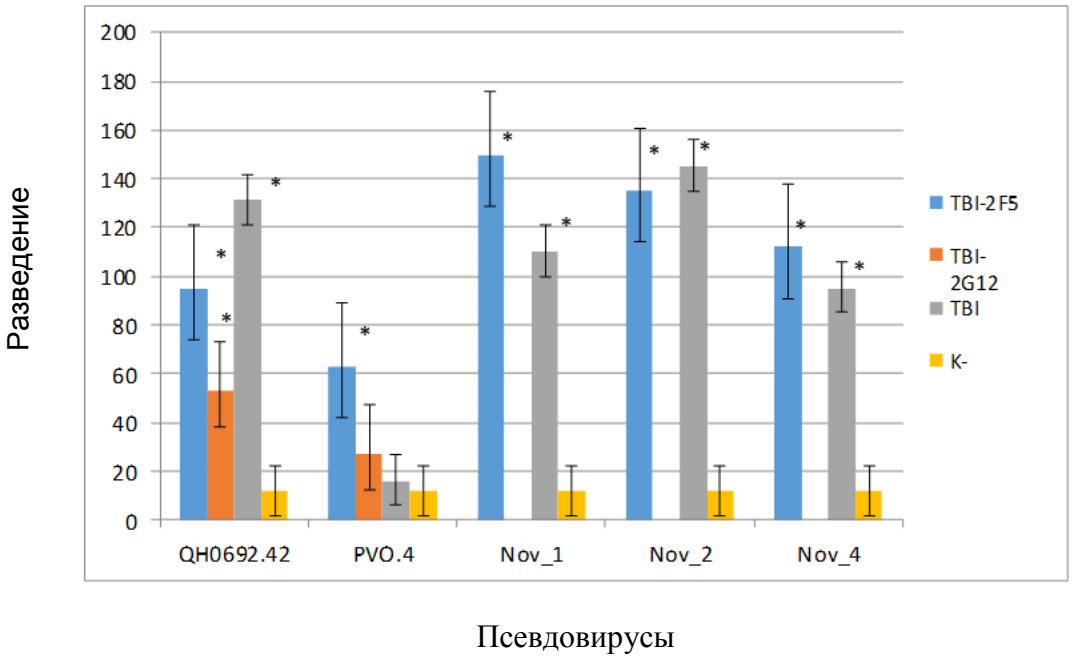

Рисунок 8. Нейтрализация псевдовирусов сыворотками мышей, иммунизированных рекомбинантными белками TBI-2F5, TBI-2G12, TBI. Результаты представлены в виде среднего значения реципрокного титра, обеспечивающего 50 %-ную нейтрализацию. 95 %-ный доверительный интервал высчитывали с помощью программы ProbitLin. Символом * обозначены значения, статистически значимо отличающиеся от отрицательного контроля

Как видно из рис. 8, сыворотка мышей, иммунизированных белком TBI-2F5, достоверно показала лучшую способность нейтрализовать устойчивый псевдовирус PVO.4 (уровень 3) по сравнению с белком TBI-2G12 и исходным белком TBI.

Чтобы оценить способность встроенных пептидов-имитаторов (RDWSFDRWSLSEFWL для TBI-2F5 и VGAFGSFYRLSVLQS для TBI-2G12) индуцировать нейтрализующие антитела, мы решили посмотреть, какой процент среди нейтрализующих антител нарабатывается на вставку пептида-имитатора. Была проведена конкуренция синтетических пептидов RDWSFDRWSLSEFWL и VGAFGSFYRLSVLQS с псевдовирусами за связывание с антителами сывороток. Концентрация пептидов была 2 мкг/мл и 7 мкг/мл (Таблица 3).

Таблица 3

Ингибирование связывания псевдовируса и иммунной сыворотки при помощи синтетических пептидов, %

Псевдовирус	**TBI-2F5**		**TBI-2G12**		**TBI**	
	Концентрация по пептиду, мкг/мл					
	2	7	2	7	2	7
QH0692.42	13.5	34.6	10.0	0	0	0
PVO.4	43.5	23.0	0	0	0	0
Nov_1	24.5	32.5	н.д.	н.д.	0	0
Nov_2	32.7	35.5	н.д.	н.д.	0	0
Nov_4	25.4	38.5	н.д.	н.д.	0	0

Как видно из табл. 3, в случае иммуногена TBI-2F5 со всеми псевдовирусами наблюдалось снижение связывания псевдовирусов с антителами сывороток и, следовательно, уменьшение нейтрализующего действия антител. Это происходит вследствие связывания пептида со специфическими антителами на вставку. Таким образом, можно говорить о том, что пептид-имитатор в составе белка TBI индуцирует образование специфических антител. В случае пептида-имитатора 2G12 эпитопа только в реакции с псевдовирусом QH0692.42 наблюдалось ингибирование связывания с антителами сыворотки. При анализе сывороток мышей, иммунизированных белком TBI, конкуренции с пептидом RDWSFDRWSLSEFWL не наблюдалось.

Таким образом, можно точно сказать, что иммунизация белком TBI-2F5 вызывает наработку специфических нейтрализующих антител, нарабатываемых на пептид-имитатор RDWSFDRWSLSEFWL.

Далее нами был проведен анализ нейтрализующей активности совокупности сывороток мышей, полученных после иммунизации белками TBI-2F5 и TBI-2G12. Реакцию нейтрализации проводили с использованием двух псевдовирусов субтипа B: QH0692.42 и PVO.4.

Оказалось, что при проведении нейтрализации смесью сывороток крови мышей наблюдается увеличение нейтрализующей активности, по сравнению с индивидуальными сыворотками (Таблица 4).

Таблица 4

Нейтрализация псевдовирусов иммунными сыворотками, %

Псевдовирус	TBI-2G12	TBI-2F5	TBI-2G12+ TBI-2F5
QH0692.42	25.6	34.4	46.5
PVO.4	0	27.9	41.6

Как видно из табл. 4, в случае псевдовируса QH0692.42 суммарная нейтрализующая активность достигла значения 46,5 %, в то время как по отдельности значения нейтрализации были ниже. Интересно также отметить, что сыворотка, полученная после иммунизации TBI-2G12, была неспособна нейтрализовать псевдовирус PVO.4, однако суммарная нейтрализующая активность в смеси с сывороткой после иммунизации белком TBI-2F5 оказалась не равна нейтрализующей активности сыворотки после иммунизации TBI-2F5 (28 %), а выше (42 %). Это может говорить о кооперативном действии антител, нарабатываемых в ответ на введение созданных нами иммуногенов. При одновременной индукции антител к нескольким эпитопам они могут обладать синергизмом действия. На этот феномен необходимо обращать внимание при создании и испытании В-клеточных иммуногенов.

ВЫВОДЫ

1. Обоснована и экспериментально подтверждена возможность использования искусственного белка TBI в качестве каркаса для включения в его состав пептидов-имитаторов эпитопов ВИЧ-1. В рамках работы:

а) получены производные белка TBI: TBI-2F5 и TBI-2G12, включающие пептиды-имитаторы эпитопов ВИЧ-1, узнаваемые МКА 2F5 и 2G12 соответственно;

б) показано, что сыворотки мышей, иммунизированных белками TBI-2F5 и TBI-2G12, специфично взаимодействуют с ними в ИФА и узнают в иммуноблоте как gp41, так и gp120 соответственно.

2. Получены и охарактеризованы 17 *env*-псевдовирусов, сконструированных на основе изолятов ВИЧ-1, циркулировавших на территории Сибирского федерального округа в 2015-2016 гг.

3. Выяснено, что 15 из полученных псевдовирусов относятся к рекомбинантной форме CRF63_02A1, а два – к субтипу A1.

4. Показано, что сыворотки мышей, иммунизированных белками TBI-2F5 и TBI-2G12, проявляют нейтрализующую активность в отношении *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 субтипа B и CRF63_02A1.

5. Показано, что смесь сывороток крови мышей, иммунизированных белками TBI-2F5 и TBI-2G12, способна нейтрализовать *env*-псевдовирусы ВИЧ-1 субтипа B более эффективно, чем индивидуальные сыворотки.

Список статей из перечня научных журналов ВАК Минобрнауки России, опубликованных по теме диссертации:

1. **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, - N. 2. – P.159-168.
2. **Shcherbakova N.S.,** Shalamova L.A., Delgado E., Fernandez-Garcia A., Vega Y., Karpenko L.I., Ilychev A.A., Sokolov Y.V., Shcherbakov D.N., Perez-Alvarez L., Thomson M.M. Molecular Epidemiology, Philogeny, and Phylodynamics of CRF63_02A1, a Recently Originated HIV-1 Circulating Recombinant Form Spreading in Siberia // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2014. – V. 30. – N. 9. – P. 912-919.
3. Karpenko L.I., **Scherbakova N.S**., Chikaev A.N., Tumanova O.Yu., 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. – N. 4. – P. 193-199.
4. **Щербакова Н.С.**, Чикаев А.Н., Карпенко Л.И., Ильичев А.А. Влияние биотинилирования антител 2F5 на отбор пептидов из комбинаторной фаговой библиотеки // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2012 - № 1. - С. 20-25.
5. Чикаев А.Н., **Щербакова Н.С.,** Карпенко Л.И., Бажан С.И., Лебедев Л.Р., Ерошкин А.М., Рыжиков А.Б., Ильичев А.А. Разработка искусственных полиэпитопныхВ-клеточных иммуногенов в качестве вакцин против ВИЧ-1 // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2011. – № 3. – Ч. 1. – С. 229-232.