

АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ИСКУССТВЕННОГО ПОЛИЭПИТОПНОГО ВИЧ-ИММУНОГЕНА

Андрей Павлович РУДОМЕТОВ¹, Надежда Борисовна АНДРЕЕВА¹,
Антон Николаевич ЧИКАЕВ², Надежда Сергеевна ЩЕРБАКОВА¹,
Ольга Николаевна КАПЛИНА¹, Лариса Ивановна КАРПЕНКО¹

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
630559, р. п. Кольцово Новосибирской области

² Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8/2

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. Решением проблемы могло бы стать создание иммуногена, способного индуцировать ВИЧ-нейтрализующие антитела широкого спектра действия (bNAbs). В отличие от обычных антител, bNAbs реагируют с консервативными эпитопами, обеспечивая защитный иммунитет против подавляющего большинства штаммов ВИЧ. Целью исследования являлось конструирование и анализ антигенных свойств полиэпитопного ВИЧ-иммуногена, включающего в свой состав эпитопы, узнаваемые bNAbs. **Материал и методы.** В качестве молекулы-носителя использован созданный ранее белок ТВ1, на основе которого был получен его модифицированный вариант – пТВ1. В его состав вошли эпитопы, узнаваемые bNAbs 10E8, 4E10, 2F5, а также линейный миметик конформационного эпитопа bNAbs VRC01. Анализ антигенных свойств эпитопов в составе пТВ1 проводили с помощью иммуноблоттинга. Для очистки пТВ1 использовали металл-хелатную хроматографию. Для оценки иммуногенных свойств пТВ1 проводили иммунизацию кроликов очищенным препаратом и определяли специфическую активность их сывороток с помощью ИФА. IgG из сывороток кроликов получали путем аффинной хроматографии на белке А. Вируснейтрализующую активность очищенных IgG определяли в реакции нейтрализации с использованием рекомбинантного вируса ВИЧ-1 92BR025. **Результаты.** Сконструирован иммуноген пТВ1, содержащий эпитопы, узнаваемые bNAbs. Получен продуцент белка пТВ1, обеспечивающий выход целевого белка до 30 % от суммы клеточных белков продуцента. Показано, что, находясь в контексте белка пТВ1, линейные эпитопы сохраняют свои антигенные свойства. При иммунизации кроликов пТВ1 индуцирует образование антител, способных нейтрализовать рекомбинантный штамм ВИЧ-1 92BR025. **Заключение.** Показана принципиальная возможность использования искусственного белка ТВ1 в качестве каркасной молекулы для экспонирования эпитопов, узнаваемых широко нейтрализующими антителами.

Ключевые слова: ВИЧ-1, полиэпитопные ВИЧ-иммуногены, эпитопы, нейтрализующие антитела широкого спектра действия, bNAbs.

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. 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 г. составило 1 220 659 человек. Сибирский федеральный округ относится к одному из самых пораженных эпидемией ВИЧ-инфекции регионов РФ.

Несмотря на то, что высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ) существенно продлевает жизнь ВИЧ-инфицированных, она не способна элиминировать вирус из организма

Рудометов А.П. – аспирант, e-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru

Андреева Н.Б. – аспирант, e-mail: andreeva_nb@vector.nsc.ru

Чикаев А.Н. – к.б.н., научный сотрудник, e-mail: chikaev@ngs.ru

Щербакова Н.С. – к.б.н., научный сотрудник, e-mail: shherbakova_ns@vector.nsc.ru

Каплина О.Н. – старший научный сотрудник, e-mail: okaplina@vector.nsc.ru

Карпенко Л.И. – д.б.н., зав. лабораторией, e-mail: karpenko@vector.nsc.ru

[3, 13]. Кроме того, высокая стоимость антиретровирусных препаратов, наличие ряда побочных эффектов и формирование вирусов с множественной лекарственной устойчивостью являются одними из наиболее важных проблем ВААРТ.

Наиболее очевидным решением проблемы распространения ВИЧ-инфекции является применение эффективной профилактической вакцины [5, 8]. К сожалению, в результате высокой генетической и, как следствие, антигенной вариабельности ВИЧ-1 до сих пор не удалось создать иммуноген, способный индуцировать формирование протективного иммунного ответа против широкого разнообразия генетических вариантов вируса.

Надежду на появление эффективной вакцины против ВИЧ дало открытие антител, способных нейтрализовать большое разнообразие генетических вариантов вируса. По этой причине они были названы нейтрализующими антителами широкого спектра действия (broadly neutralizing antibodies, bNAbs) [1, 15]. Способность bNAbs связывать и нейтрализовать большое число разнообразных штаммов ВИЧ-1 обеспечивается тем, что они взаимодействуют с консервативными участками вируса. В настоящее время усилия ряда исследовательских групп направлены на разработку иммуногенов, способных индуцировать наработку таких bNAbs [9].

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 к строго определенным протективным эпитопам и одновременно исключает вероятность появле-

ния нежелательных детерминант, вызывающих индукцию аутоантител или антител, увеличивающих инфекционность вируса [10].

Целью данной работы являлись конструирование и анализ антигенных и иммуногенных свойств искусственного полиэпитопного ВИЧ-иммуногена с эпитопами, узнаваемыми нейтрализующими ВИЧ-1 антителами широкого спектра действия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Моноклональные антитела, линии клеток, штаммы бактерий, плазмиды, ферменты. Моноклональные антитела (МКА) 4E10 (№ 10091), VRC01 (№ 12033), 10E8 (№ 12294), 2F5 (№ 1475), эукариотические клетки U87.CD4.CCR5 (№ 4035) и плазида pSVIII-92BR025.9 (№ 3083) получены в рамках программы предоставления реактивов NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (США). Штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen) и эукариотические клетки НЕК 293Т/17 предоставлены отделом «Коллекции микроорганизмов» Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Россия). Эндонуклеазы рестрикции XbaI и Sfr274I приобретены в компании «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия).

Конструирование генов рекомбинантных белков. При проектировании белков TBI_tag и nTBI за основу взят ранее разработанный белок TBI (Т- и В-клеточный иммуноген) – компонент кандидатной вакцины «КомбиВИЧвак» [4, 11, 12] (рис. 1, а). Оптимизацию кодового состава гена TBI проводили с помощью онлайн-ресурса GenScript (<https://www.genscript.com/>). Гены, кодирующие спроектированные белки TBI_tag и

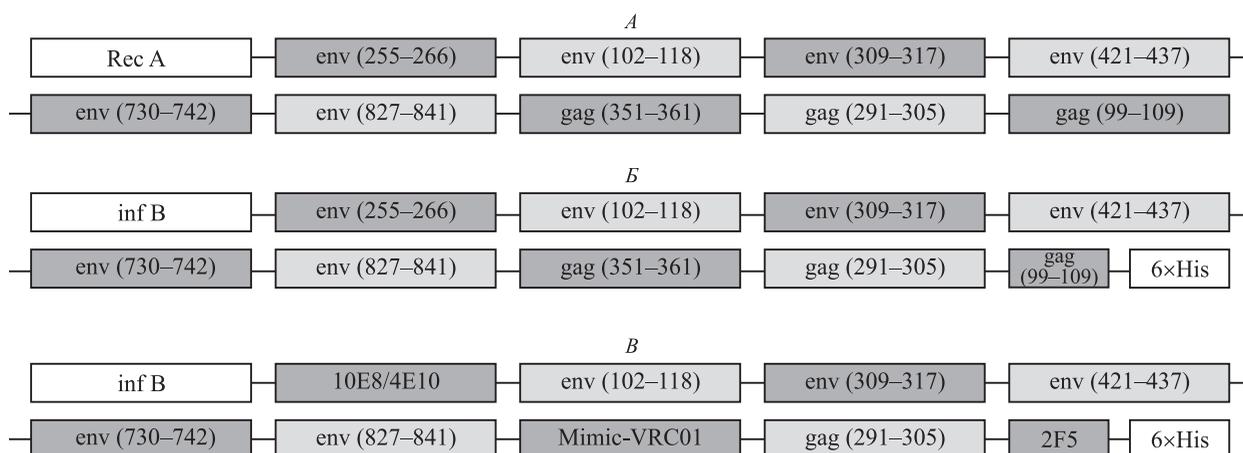


Рис. 1. Схематическое изображение структуры иммуногенов TBI (A), TBI_tag (Б) и nTBI (B). Темным фоном выделены В-клеточные эпитопы, светлым – Тh-эпитопы. RecA – фрагмент белка *P. mirabilis* RecA. InfB – фрагмент белка-активатора транскрипции *E. coli* InfB. 6 × His – шесть аминокислотных остатков гистидина

nTBI, были синтезированы компанией «Евроген» (Москва, Россия) и затем клонированы в составе плазмидного вектора pET21a (Novagen) по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции XbaI и Sfr274I. Структура целевых плазмид pET-nTBI и pET-TBI_tag подтверждена секвенированием в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН (Новосибирск, Россия).

Наработка и очистка рекомбинантных белков nTBI и TBI_tag. Бактериальные штаммы-продуценты белков nTBI и TBI_tag получали путем трансформации компетентных клеток *E. coli* BL21 (DE3) pLysS плазмидами pET-nTBI и pET-TBI_tag. Для наращивания биомассы отдельные колонии клеток *E. coli* BL21 культивировали в течение ночи в среде LB (0,5 % дрожжевого экстракта, 1 % триптона и 0,5 % NaCl) с ампициллином (50 мкг/мл). Ночную культуру добавляли к 150 мл среды LB в соотношении 1:100 и культивировали при 37 °C и 160 об/мин до значения оптической плотности $OD_{\lambda 600} = 0,5$. Экспрессию генов nTBI и TBI_tag индуцировали добавлением 100 мкл 1M изопропил- β -D-1-тиоигалактопиранозид (ИПТГ) (Медиген, Россия). Бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 6000 g 5 мин при 4 °C (Beckman Coulter Avanti J-30I, США). Биомассу дезинтегрировали ультразвуком на льду с использованием гомогенизатора Soniprep 150 Plus (MSE, Великобритания). Дебрис осаждали центрифугированием и растворяли в 6M мочевины. Рекомбинантные белки очищали 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 по Леммли в 15%-м полиакриламидном геле (SDS-PAGE) с последующей фиксацией и окрашиванием Кумасси G250.

Дот-блот анализ. Дот-блот-анализ проводили с использованием системы SNAP i.d. (Millipore, США). На нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, Австрия) наносили в четыре точки по 1 мкл 2-кратных последовательных разведений белков TBI_tag и nTBI (стартовая концентрация 0,25 мг/мл), затем блокировали 1%-м бычьим сывороточным альбумином (БСА) в фосфатно-солевом буфере (PBS) и промывали 3 раза промывочным буфером (PBS с 0,1 % Tween 20). Мембрану помещали в раствор МКА VRC01, 10E8, 2F5 или 4E10, разбавленный в блокирующем буфере (PBS, 1 % БСА) в соотношении 1:10000, инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре и отмывали 3 раза промывочным буфером. Далее мембраны инкубировали 10 мин с конъюгированными с щелочной фосфатазой антителами кролика против IgG человека

(Sigma, США), разбавленными в блокирующем буфере в соотношении 1 : 5000, затем промывали 5 раз промывочным буфером. Иммуный комплекс визуализировали добавлением NBT/BCIP-субстратного раствора (Sigma, США).

Иммунизация животных. В экспериментах использовали 4-месячных кроликов-самцов (вес 1,6–2 кг) породы шиншилла. Животных содержали в отдельных клетках (виварий Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор») на стандартном рационе со свободным доступом к пище и воде. Эксперименты одобрены на заседании Биоэтической комиссии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (протокол № 2 от 17.02.2017) и выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

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 – белком TBI_tag, которые вводили трехкратно на 1-й, 14-й и 28-й дни. 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. На 14-й день после последней иммунизации производился забор образцов крови, из которых получали сыворотки и анализировали их на наличие специфических антител.

Очистка фракций суммарных IgG из сывороток иммунизированных кроликов. Очищенные IgG из сывороток кроликов получали путем аффинной хроматографии на белке А (BioVision, США) в соответствии с протоколом производителя. Степень очистки IgG оценивали с помощью SDS-PAGE. Очищенные препараты IgG хранили при –40 °C.

Иммуноферментный анализ. Специфическую активность сывороток иммунизированных кроликов оценивали с помощью ИФА. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки, взятые до иммунизации животных. Белки nTBI или TBI_tag (5 мкг/мл) сорбировали на 96-луночные планшеты (Thermo Fisher Scientific, США), блокировали BSA, после этого вносили восемь серийных разведений образцов сывороток, в трех повторах. Затем в лунки добавляли антитела козы против антител кроликов, конъюгированные с щелочной фосфатазой, инкубировали, отмывали

ли от несвязавшихся антител и вносили раствор субстрата BCIP/NBT (Sigma, США). Оптическую плотность измеряли при длине волны OD₄₀₅ (Model 680 Micro plate reader, Bio Rad, США). Все эксперименты проводили в трех повторах. Учитывались значения OD, превышающие в два раза средний фон преиммунной сыворотки кролика. Для оценки достоверности различий полученных значений использовали критерий Стьюдента.

Анализ нейтрализующей активности очищенных IgG. Наличие вируснейтрализующей активности очищенных IgG определяли путем постановки реакции нейтрализации с использованием рекомбинантного вируса ВИЧ-1 92BR025 (уровень устойчивости 1В) и клеток-мишеней U87.CD4.CCR5, как описано ранее [6, 14]. Для анализа использовали суммарный пул IgG каждой группы. 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При конструировании нового иммуногена за основу взят ранее разработанный искусственный белок TBI, содержащий четыре Th-клеточных эпитопа и пять В-клеточных эпитопов из белков ВИЧ-1 [4, 11, 12] (см. рис. 1, а). Исходный вариант гена, кодирующего белок TBI, находился в составе плазмиды pTBI под контролем индуцибельного промотора *recA* из *Proteus mirabilis* (см. рис. 1, а) [4]. Данная система не позволяла добиться высокого выхода целевого белка, поэтому были проведены работы по улучшению продуцента белка TBI и упрощению схемы его очистки, для чего была выполнена оптимизация кодонного состава гена *TBI* для оптимальной экспрессии в системе *E. coli*. При смене экспрессионного вектора на pET21a ген *TBI* клонировали в общей рамке считывания с последовательностью, кодирующей шесть аминокислотных остатков (а.о.) гистидина (рис. 1, б), для упрощения очистки рекомбинантного белка. Кроме того, 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* [7]. Оптимизированный вариант TBI был назван TBI_tag (см. рис. 1, б). В результате оптимизации структуры гена уровень продукции TBI_tag в клетках *E. coli* увеличился в несколько раз по сравнению с исходным TBI.

Для улучшения иммуногенных свойств белка TBI_tag был изменен его эпитопный состав. Три В-клеточных эпитопа были заменены на последовательность, узнаваемую bNAbs 10E8 и 4E10 (NWFNITNWLWYIK), эпитоп, узнаваемый bNAbs 2F5 (NEQELLELDKWASLWN), и мимотоп, узнаваемый VRC01 (VSWPELYKWTWS). Поскольку bNAbs VRC01 узнает конформационный эпитоп ВИЧ-1, который невозможно воспроизвести в составе полиэпитопной конструкции, для замены использовался его линейный имитатор, полученный ранее с помощью фагового дисплея [2]. Т-хелперные эпитопы TBI_tag не подвергали изменениям, поскольку они формируют альфа-спиральный каркас белка. Модифицированный вариант белка был назван nTBI (рис. 1, в).

Синтезированные гены, кодирующие TBI_tag и nTBI, были клонированы в составе плазмидного вектора pET21a и экспрессированы в клетках *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. На рис. 2, а представлена электрофореграмма лизатов клеток-продуцентов рекомбинантных белков. Выход белков TBI_tag и nTBI составлял до 30 % от суммы клеточных белков продуцента. В ходе процедуры очистки установлено, что рекомбинантные белки TBI_tag и nTBI находятся в тельцах включения, поэтому была использована схема очистки, включающая дезинтеграцию клеток ультразвуком, экстракцию белков из тельца включения раствором мочевины, аффинную хроматографию с использованием Ni-NTA-агарозы и рефолдинг целевых белков с помощью диализа. Чистоту белков TBI_tag и nTBI дополнительно проверяли с помощью SDS-PAGE. В конечном препарате степень очистки белка составляла более 98 %.

Антигенные свойства эпитопов, узнаваемых bNAbs в составе nTBI, исследованы с помощью дот-блот анализа с использованием МКА. Установлено, что линейные В-клеточные эпитопы, включенные в состав nTBI, взаимодействуют с соответствующими МКА (2F5, 10E8 и 4E10), за исключением имитатора эпитопа, узнаваемого антителом VRC01 (рис. 2, б). Будучи экспонированным на поверхности фаговой частицы, данный мимотоп с высокой аффинностью связывался с VRC01 [2]. Однако, находясь в составе nTBI, мимотоп, возможно, оказывается экранирован аминокислотным окружением фланкирующих последовательностей, в результате чего теряет способность связываться с МКА VRC01.

Для изучения иммуногенности рекомбинантных белков проводили иммунизацию кроликов TBI_tag и nTBI и оценивали активность иммунных сывороток с помощью ИФА. Показано, что в сыворотках крови обеих групп животных содержатся антитела, специфичные к исследуемым

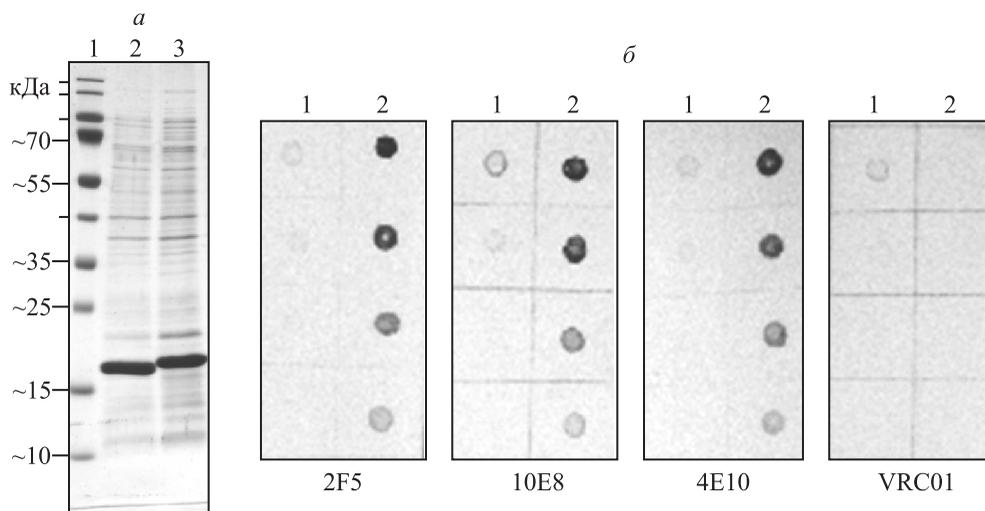


Рис. 2. а – электрофореграмма лизатов клеток *E. coli* BL21 (DE3) pLysS после индукции ИПТГ, несущих плазмиды pET-nTBI и pET-TBI_tag, в 15%-м PAGE: 1 – маркер молекулярной массы PageRuler (Thermo, США), 2 – лизат клеток *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pET-nTBI, 3 – лизат клеток *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pET-TBI_tag. б – дот-блот анализ взаимодействия рекомбинантных белков TB1_tag (1) и nTBI (2) с моноклональными антителами 2F5, 10E8, 4E10 и VRC01

иммуногенам. Средние титры антител в сыворотках кроликов, иммунизированных как TB1_tag, так и nTBI, достигали 1:3 000 000 после третьей иммунизации, между кроликами в группах существенной разницы в титре сывороток не наблюдалось. Сигнал преиммунных сывороток в ИФА не превышал фоновый уровень.

Для оценки вируснейтрализующей активности антител из сывороток иммунизированных животных выделены фракции IgG, которые исследовали в реакции вируснейтрализации с использованием рекомбинантного штамма ВИЧ-1 92BR025, входящего в панель рекомбинантных ВИЧ-1 для анализа нейтрализующей активности антител. Установлено, что и TB1_tag, и nTBI

индуцирует наработку антител, нейтрализующих штамм 92BR025 (рис. 3, а, б). При этом уровень вируснейтрализующей активности IgG, индуцированных nTBI, был выше, чем IgG, индуцированных TB1_tag. Величина IC₅₀, при которой наблюдалось 50%-я нейтрализация вируса, для анти-nTBI IgG составляла 1380 мкг/мл, для анти-TB1_tag – 2630 мкг/мл. IC₅₀ для МКА 4E10, которое было использовано в качестве положительного контроля, составило 0,72 мкг/мл, что соответствует литературным данным [16].

Полученные результаты нейтрализующей активности IgG говорят об улучшении иммуногенных свойств белка nTBI по сравнению с его исходным вариантом – TB1_tag.

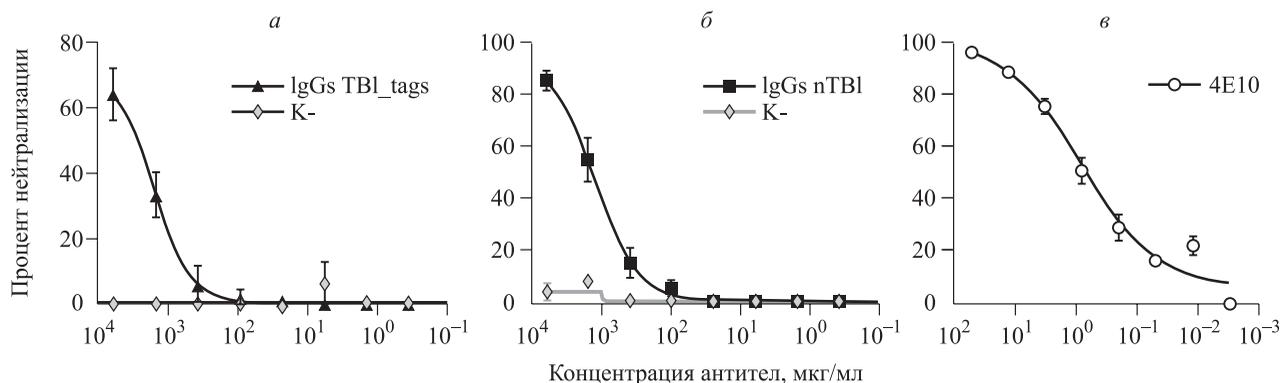


Рис. 3. Нейтрализующая активность IgG, выделенных из сывороток иммунизированных животных, в отношении рекомбинантного штамма ВИЧ-1 92BR025. а – кривые нейтрализации для анти-TBI_tag IgGs; б – кривые нейтрализации для анти-nTBI IgGs; в – кривые нейтрализации для МКА 4E10, положительный контроль. В качестве отрицательного контроля (K-) использовались IgGs, выделенные из преиммунных сывороток

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание иммуногена, способного обеспечить защиту от заражения и развития ВИЧ-инфекции, до сих пор является нерешенной и актуальной задачей. Вполне вероятно, что для создания эффективной вакцины будет необходимо использовать комбинацию нескольких концепций. Мы предлагаем концепцию создания ВИЧ-иммуногенов на основе полностью искусственных полиэпитопных белков, включающих протективные Т- и В-клеточные эпитопы из вирусных антигенов.

В результате проделанной работы сконструирован белок пТВИ, содержащий эпитопы, узнаваемые широко нейтрализующими МКА 10E8, 4E10, 2F5, и линейный имитатор конформационного эпитопа, узнаваемого МКА VRC01. С помощью иммуноблотинга установлено, что линейные эпитопы, узнаваемые бNAbs, за исключением пептида-имитатора VRC01, сохраняют свои антигенные свойства в составе рекомбинантного белка пТВИ. Мимотоп VRC01, находясь в составе пТВИ, перестал узнаваться МКА VRC01, вероятно, из-за изменения своей конформации в соответствующем пептидном окружении. Этот факт нужно учитывать в работах по созданию ВИЧ-иммуногенов в будущем. В то же время пТВИ индуцирует антитела, обладающие более высоким уровнем вируснейтрализующей активности по сравнению с антителами к исходному варианту ТВИ_tag. Полученные результаты говорят о том, что искусственные мозаичные полиэпитопные белки можно рассматривать как один из подходов для разработки кандидатных вакцин против ВИЧ-1.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-00660).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Burton D.R., Hangartner L.* Broadly neutralizing antibodies to HIV and their role in vaccine design // *Annu. Rev. Immunol.* 2016. 34. 634–659.
2. *Chikaev A.N., Bakulina A.Yu., 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. 10. (3). 1–13.

3. *Eisinger R.W., Fauci A.S.* Ending the HIV/AIDS Pandemic // *Emerg. Infect. Dis.* 2018. 24. (3). 413–416.
4. *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 Eng.* 1995. 8. (2). 167–173.
5. *Fauci A.S.* An HIV vaccine is essential for ending the HIV/AIDS pandemic // *JAMA.* 2017. 318. 1535–1536.
6. *González 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. 13. (3). 1–11.
7. *Hansted J.G., Pietikäinen L., Hög F., Sperling-Petersen H.U., Mortensen K.K.* Expressivity tag: a novel tool for increased expression in *Escherichia coli* // *J. Biotechnol.* 2011. 155. (3). 275–283.
8. *Haynes B.F.* New approaches to HIV vaccine development // *Curr. Opin. Immunol.* 2015. 35. 39–47.
9. *Haynes B.F., Burton D.R.* Developing an HIV vaccine // *Science.* 2017. 355. (6330). 1129–1130.
10. *Karpenko L.I., Bazhan S.I., Antonets D.V., Belyakov I.M.* Novel approaches in polyepitope T-cell vaccine development against HIV-1 // *Expert Rev. Vaccines.* 2014. 13. (1). 155–173.
11. *Karpenko L.I., Bazhan S.I., Bogryantseva M.P., Ryndyuk N.N., Ginko Z.I., Kuzubov V.I., Lebedev L.R., Caplina O.N., Reguzova A.Yu., 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 // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2016. 42. (2). 170–182.
12. *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., 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. 25. (21). 4312–4323.
13. *Lorenzo-Redondo R., Fryer H.R., Bedford T., Kim E.Y., Archer J., Pond S.L.K., Chung Y.S., Penugonda S., Chipman J., 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. 530. (7588). 51–56.
14. *Medina-Ramírez M., Sa'nchez-Merino V., Sa'nchez-Palomino S., Merino-Mansilla A., Ferreira C.B., Pérez I., González N., Alvarez A., Alcocer-González J.M., García F., Gatell J.M., Alcamí J., Yuste E.* Broadly Cross-Neutralizing Antibodies in HIV-1 Patients with Undetectable Viremia // *J. Virol.* 2011. 85. 5804–5813.

15. 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. 7. (4). 11–21.

16. 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. 6. 1–10.

ANTIGENIC PROPERTIES OF ARTIFICIAL POLYEPILOPE HIV IMMUNOGEN

**Andrey Pavlovich RUDOMETOV¹, Nadezhda Borisovna ANDREEVA¹,
Anton Nikolaevich CHIKAEV², Nadezhda Sergeevna SHCHERBAKOVA¹,
Olga Nikolaevna KAPLINA¹, Larisa Ivanovna KARPENKO¹**

¹ *State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor
630559, Koltsovo, Novosibirsk region*

² *Institute of Molecular and Cell Biology of SB RAS
630090, Novosibirsk, Academician Lavrentiev av., 8/2*

The development of immunogen being capable of providing protection against HIV-1 infection and progression is still topical and unsolved challenge. Since HIV-1 demonstrates strong genetic variability, an efficient vaccine should provide protection against a number of various virus strains. Design of immunogen with capacity to induce broadly neutralizing antibodies to HIV is believed to solve this issue. As distinct from usual antibodies, bNAbs interact with conservative epitopes providing protective immunity to overwhelming majority of HIV strains. Our study **aims to** construct and analyze antigenic features of polyepitope HIV-immunogen nTBI comprising epitopes recognized by bNAbs. **Materials and methods.** We used previously designed TBI protein as molecule-carrier and obtained on this basis protein's modified variant nTBI. It includes epitopes recognized by bNAbs 10E8, 4E10, 2F5, as well as linear mimetic of conformation epitope bNAb VRC01. Immunoblotting was used to analyze antigenic properties of epitopes in composition of nTBI. To purify nTBI, we used metal chelate chromatography. To study immunogenic properties, we immunized rabbits with purified nTBI preparation. Specific activity of sera from immunized rabbits was identified using ELISA. Affine chromatography on protein A was used to obtain IgG from sera of rabbits. Virus-neutralizing activity of purified IgG was detected in neutralization test using recombinant virus HIV-1 92BR025. **Results.** Immunogen nTBI comprising epitopes recognized by bNAbs was constructed. We obtained protein nTBI producer providing production of target protein up to 30 % of the amount of producer cell proteins. We showed that in the context of nTBI protein linear epitopes retain their antigenic properties. When immunizing rabbits, we found nTBI inducing production of antibodies capable of neutralizing recombinant HIV-1 strain 92BR025. **Conclusion.** We demonstrated principal possibility of the use of artificial TBI protein as a scaffold molecule to expose epitopes recognized by broadly neutralizing antibodies.

Key words: HIV-1, polyepitope HIV immunogen, epitopes, broadly neutralizing antibodies, bNAbs.

Rudometov A.P. – post-graduate student, e-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru

Andreeva N.B. – post-graduate student, e-mail: andreeva_nb@vector.nsc.ru

Chikaev A.N. – candidate of biological sciences, researcher, e-mail: chikaev@ngs.ru

Shcherbakova N.S. – candidate of biological sciences, researcher, e-mail: shherbakova_ns@vector.nsc.ru

Kaplina O.N. – senior researcher, e-mail: okaplina@vector.nsc.ru

Karpenko L.I. – doctor of biological sciences, head of the laboratory, e-mail: karpenko@vector.nsc.ru