

УДК: 57.083.3:616-097:616.98:578.828HIV

ХИМЕРНЫЕ ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ, ЭКСПОНИРУЮЩИЕ ИМИТАТОРЫ ЭПИТОПА ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО ВИЧ-1 АНТИТЕЛА

Рудометов А.П., Рудометова Н.Б., Зайцев Б.Н., Ильичев А.А., Карпенко Л.И.

ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

Для создания вакцины против ВИЧ-1 были испробованы все известные подходы, но тем не менее эффективной вакцины против данного патогена по-прежнему нет. Относительно новый и перспективный подход заключается в рациональном дизайне иммуногенов, направленных на то, чтобы сфокусировать иммунный ответ на уязвимых участках вируса. Считается, что высоко-консервативные эпитопы присутствуют в белковых областях, необходимых для «выживания» вируса, поэтому данные эпитопы в совокупности можно рассматривать как идеальный антиген для создания вакцины. В данной работе в качестве белка носителя был использован коровий белок вируса гепатита В (HBcAg), который рассматривается как перспективная платформа для получения высокоиммуногенных вакцин. Так как эпитопы большинства широконейтрализующих антител являются конформационными, в данной работе были использованы в том числе пептиды-имитаторы, полученные с помощью фагового дисплея. На основе плазмиды, кодирующей HBcAg, получены рекомбинантные плазмиды, кодирующие варианты HBcAg, включающие эпитопы и имитаторы эпитопа, узнаваемые антителами VRC34.01 и VRC01 соответственно. С помощью электронной микроскопии показано, что химерный вариант HBcAg-c7cVRC01 формирует частицы характерной сферической формы. Иммуногенность полученных рекомбинантных белков, исследована на модели кроликов. Установлено, что сыворотки животных, иммунизированных химерными вариантами HBcAg, обладают нейтрализующей активностью в отношении псевдовруса SF162.LS (подтип В).

Ключевые слова: ВИЧ-1, bNAbs, иммуногены, HBcAg, VLPs

CHIMERIC VIRUS-LIKE PARTICLES THAT EXPOSE EPITOPES WITH HIV-1 BROADLY NEUTRALIZING ANTIBODIES

Rudometov A.P., Rudometova N.B., Zaitsev B.N., Ilyichev A.A., Karpenko L.I.

FBUN State research center of virology and biotechnology "Vector" of the Federal service for surveillance on consumers rights protection and human wellbeing, Koltsovo, Russia

All known approaches were tested in order to create a vaccine against HIV-1, however currently there is no effective vaccine against this pathogen. Relatively new and perspective approach involves rational design of immunizers aimed at focusing immune response against vulnerable virus regions. It is considered that highly conservative epitopes are located in protein-based regions and are essential for survival of the virus. Such epitopes can be regarded as ideal antigens for vaccine development. Core protein of Hepatitis B virus (HBcAg) that is regarded as a perspective platform for developing highly immunogenic vaccines was utilized as a carrier protein in current research. Because epitopes of a majority of broadly neutralizing antibodies are conformational current study utilized mediator-peptides that were obtained by means of phage display. Recombinant plasmids that contained epitopes and epitope imitators that are recognized by antibodies VRC34.01 and VRC01 respectively were derived on a basis of plasmid coding HBcAg. Electronic microscopy showed that chimeric variant HBcAg-c7cVRC01 forms particles of specific spherical shape. Immunological potency of obtained recombinant proteins was tested on rabbit model. It was revealed that animal serum that was immunized with chimeric variants of HBcAg had neutralizing activity against SF162.LS (subtype B) pseudovirus.

Key words: HIV-1, bNAbs, immunizer, HBcAg, VLPs

Актуальность проблемы, связанной с ВИЧ-инфекцией, обусловлена весомым социально-экономическим ущербом и эпидемической значимостью этого заболевания, повсеместным распространением, тяжелыми последствиями, активным вовлечением в эпидемический процесс лиц репро-

дуктивного 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. Однако, несмотря на то, что высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ) существенно продлевает и улучшает качество жизни ВИЧ-инфицированных, она не способна элиминировать вирус из организма [8, 12]. Кроме того, среди наиболее важных проблем ВААРТ можно назвать высокую стоимость антиретровирусных препаратов, наличие ряда побочных эффектов и формирование вирусов с множественной лекарственной устойчивостью. В настоящее время ВИЧ-1 вышел из таких групп уязвимости как потребители инъекционных наркотиков (ПИН) и гомосексуалисты (МСМ), и сейчас все больше случаев приходится на гетеросексуальный путь передачи. Стоимость лечения, возникающая лекарственная устойчивость и, как следствие, неэффективность лечения диктуют настоятельную необходимость разработки эффективной профилактической вакцины против ВИЧ-1.

Работы по созданию вакцины продолжают интенсивно развиваться. В настоящее время большие надежды исследователи связывают с разработкой иммуногенов, индуцирующих антитела, способные нейтрализовать широкий спектр изолятов ВИЧ-1 (bNAbs) [3, 4]. Такие нейтрализующие антитела были обнаружены у ВИЧ-инфицированных долгожителей (non-progressors). Особенности bNAbs описаны в работах, в которых показано, что введение нейтрализующих антител может блокировать инфекцию у нечеловеческих приматов [9], поэтому формирование bNAbs с помощью вакцинации является желаемой целью.

Иммунная система позвоночных эволюционировала таким образом, чтобы распознавать и реагировать на частицы размером с нано и микрометр, такие как вирусы и бактерии. Наночастицы поступают в лимфоидные ткани, интернализируются и обрабатываются для презентации антигена дендритными клетками и активируют В-клетки путем перекрестного связывания их рецепторов [6]. Особенности иммунного распознавания наночастиц или по-другому вирусоподобных частиц (virus-like particles, VLPs), привели к использованию антигенов VLPs в лицензированных вакцинах, таких как вакцины против вируса папилломы человека и вируса гепатита В, и мотивировали на разработку иммуногенов на основе наночастиц при разработке новых вакцин [10]. В том числе подход, направленный на конструирование химерных вирусоподобных частиц, экспонирующих эпитопы, узнаваемые bNAbs, является одним из перспективных направлений при разработке ВИЧ-вакцин. Генно-инженерные наночастицы или VLPs, получают на основе вирусных структурных белков, обладающих способностью к самосборке. Одним из успешных примеров VLPs является коровий антиген вируса гепатита В (HBcAg) [5, 13].

Целью данной работы было конструирование и анализ иммуногенных свойств химерных частиц HBcAg, экспонирующих эпитопы, узнаваемые антителами, способными нейтрализовать широкий спектр генетических вариантов ВИЧ-1.

Материалы и методы

Олигонуклеотиды, кодирующие выбранные аминокислотные последовательности, рассчитывали с использованием программы SnapGene 3.2.1. Олигонуклеотиды рассчитывались таким образом, чтобы при отжиге они образовывали дуплекс с липкими концами, аналогичные тем, которые образуются при обработке плазмидного вектора эндонуклеазами рестрикции BamHI и BsiWI, или XhoI. Рассчитанные олигонуклеотиды были синтезированы компанией «ДНК-Синтез» (Москва, Россия).

В качестве векторов были использованы две рекомбинантные плазмиды pET-HBcAg и pET-HBcAg1-149. Рекомбинантная плазида pET-HBcAg содержит ген HBcAg, в котором область главной антигенной детерминанты кора фланкирована двумя уникальными сайтами рестрикции BamHI и BsiWI в позициях а.о. 79 и 87, по которым были клонированы имитаторы эпитопа, узнаваемого антителом VRC01, и фрагменты пептида слияния. Рекомбинантная плазида pET-HBcAg1-149 содержит укороченный вариант гена HBcAg, кодирующий с 1 по 149 а.о., и содержит уникальный сайт рестрикции XhoI в области 81 а.о., по которому также были клонированы имитаторы эпитопа, узнаваемого антителом VRC01. Целостность полученных генетических конструкций подтверждали с помощью секвенирования.

Бактериальные штаммы-продуценты рекомбинантных белков получали путем трансформации компетентных клеток *E. coli* BL21 (DE3) pLysS соответствующими плазмидами. Культивирование штаммов-продуцентов и очистку химерных вариантов HBcAg проводили по оптимизированной нами схеме, как было описано ранее [1, 2]. Степень очистки целевого белка оценивали с помощью SDS-PAGE.

Для анализа антигенных свойств имитаторов эпитопа антитела VRC01 в составе химерных вариантов HBcAg был проведен дот-блот-анализ с использованием моноклонального антитела (МКА) VRC01, как было описано ранее [1, 2].

Для того чтобы проанализировать способность полученных химерных вариантов HBcAg образовывать вирусоподобные частицы, была проведена электронная микроскопия. Исследование проводилось в отделе микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Был применен метод негативного контрастирования образцов 1 % раствором уранилацетата. Исследование проводили с использованием электронного микроскопа JEM100C.

Очищенными препаратами химерных вариантов НВсАг была проведена иммунизация кроликов. В экспериментах использовали 4-месячных кроликов-самок (вес 1,6–2 кг) породной принадлежности шиншилла. Эксперименты были одобрены на заседании Биоэтической комиссии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» и выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

Животные были разделены на 2 группы (n=3). Опытной группе вводили последовательно препараты белков НВсАг-c7cVRC01, НВсАг-12merVRC01, НВсАг1-149-c7cVRC01 и НВсАг1-149-12merVRC01 на 1-й, 14-й, 28-й и 42-й дни. При первой иммунизации подкожно вводили по 500 мкг исследуемого иммуногена с неполным адьювантом Фрейнда, при последующих иммунизациях – по 800 мкг образца без адьюванта. Второй контрольной группе вводили при первой иммунизации неполный адьювант Фрейда, при последующих иммунизациях физиологический раствор, с таким же интервалом, как и в опытной группе. Перед каждой иммунизацией и через две недели после последней иммунизации был проведен забор образцов крови, из которых получали сыворотки.

Далее, с помощью ИФА, оценивали специфическую активность сывороток кроликов, иммунизированных рекомбинантными белками, сопоставляя с контролем - сыворотками, полученными от кроликов до иммунизации, и сыворотки из контрольной группы. ИФА проводили как было описано ранее [3]. При определении титра сывороток максимальным разведением считали разведение, значение ОП которого превышало в два раза ОП отрицательного контроля (при том же разведении). Графики были построены с помощью программы GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, США).

Нейтрализующую активность сывороток кроликов, иммунизированных рекомбинантными вариантами НВсАг, определяли в реакции вируснейтрализации с использованием env-псевдовирюсов ВИЧ-1 как было описано ранее [14]. В качестве положительного контроля было использовано МКА VRC01. Статистическую обработку данных и построение графиков проводили с использованием программы GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, США).

Результаты и обсуждение

В качестве белка, презентующего эпитопы bNAbs иммунной системе, в данной работе был использован НВсАг. НВсАг образует частицу размером около 36 нм, состоящую из 240 копий НВсАг, собранных в виде 120 гомодимеров. В ряде работ было показано, что чужеродная последовательность, встроенная во внутреннюю область 75–83 а.о. петли НВсАг, является значительно более антигенной и иммуногенной, чем та же последовательность, расположенная на N- или С-конце белка-носителя. Ранее была продемонстрирована возможность сборки химерных частиц НВсАг при внедрении широкого спектра чужеродных эпитопов [13]. Тем не менее, существуют данные о том, что ряд эпитопов, встроенных в НВсАг, нарушают сборку коровых частиц и уменьшают уровень экспрессии рекомбинантного гена. Поэтому ранее нами была получена оригинальная нуклеотидная последовательность гена НВсАг, в которую были введены уникальные сайты рестрикции [2].

Стоит также отметить и то, что одной из наиболее сложных задач при конструировании иммуногенов, направленных на индукцию bNAbs, является адекватное воспроизведение конформационных эпитопов. Возможным решением проблемы может быть использование линейных пептидов-имитаторов конформационных антигенных детерминант ВИЧ-1, отобранных методами комбинаторной биологии, например, с использованием технологии фагового дисплея, что в том числе было реализовано и в нашей работе. Для работы были выбраны 2 пептида, имитирующие конформационный эпитоп bNAbs VRC01, полученные ранее в нашей лаборатории с помощью технологии фагового дисплея: один пептид-имитатор из 12-мерной линейной фаговой библиотеки New England BioLabs Ph.D.™-12 (VSWPELYKWTWS), и один из семимерной кольцевой фаговой библиотеки New England BioLabs Ph.D.™- C7C (CNWEFWKYC), показавшие лучшие результаты в реакции конкурентного ингибирования нейтрализации вируса [7]. Для достижения протективного гуморального иммунного ответа при иммунизации необходима индукция bNAbs сразу к нескольким консервативным регионам. Одним из таких регионов является пептид слияния (fusion peptide, FP), который является ключевым элементом в процессе проникновения ВИЧ-1 в клетку мишень, и расположен на N-конце субъединицы gp41. Для этого мы использовали фрагменты FP с 512 по 519 а.о. подтипов ВИЧ-1 А6 и рекомбинантной формы CRF63_02A – VVGLGAVF и AIGLGAAF соответственно, узнаваемые bNAbs VRC34.01 [11].

Затем был проведен дизайн олигонуклеотидных дуплексов, кодирующих желаемые аминокислотные последовательности. Олигонуклеотиды были синтезированы и клонированы в составе плазмид pET-НВсАг и pET-НВсАг1-149. В результате было получено 6 рекомбинантных плазмид, кодирующих химерные варианты НВсАг, включающие имитаторы эпитопа антитела VRC01 и фрагменты FP, узнаваемые антителом VRC34.01.

С использованием сконструированных плазмид, несущих пептиды-имитаторы антитела VRC01, на основе штамма *E. coli* BL21 получены штаммы-продуценты химерных вариантов НВсАг: НВсАг-c7cVRC01, НВсАг-12merVRC01, НВсАг1-149-c7cVRC01, НВсАг1-149-12merVRC01. Разработаны протоколы выделения и очистки, подобрана схема диализа (рефолдинга) рекомбинантных белков-иммуногенов, что позволило наработать растворимые образцы (рис. 1).

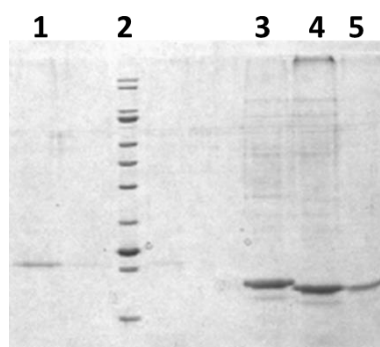


Рис. 1. Электрофореграмма белков в 15 % SDS-PAGE: 2 – маркер молекулярной массы M31 (СибЭнзим, Россия); 1, 3, 4, 5 – очищенные белки HBcAg-12merVRC01, HBcAg1-149-c7cVRC01, HBcAg1-149-12merVRC01 и HBcAg-c7cVRC01 соответственно.

С помощью электронной микроскопии показано, что варианты белков HBcAg-c7cVRC01 формируют частицы характерной сферической формы. Размеры частиц, формируемые данными вариантами, незначительно отличаются от частиц нативного HBcAg, размер которых равен 30-36 нм. Для химерного варианта HBcAg1-149-12merVRC01 было установлено, что он образует частицы неправильной формы и большего размера (рис. 2).

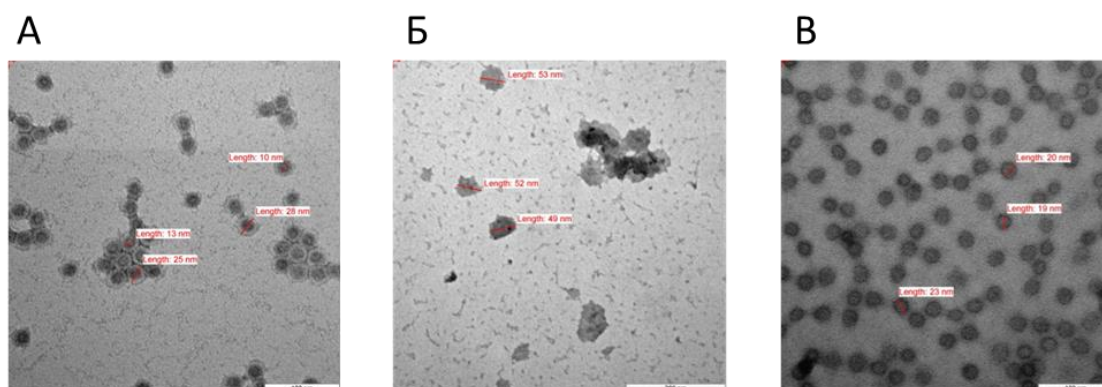


Рис. 2. Электронная микрофотография препаратов химерных белков: А – HBcAg-c7cVRC01(масштаб 100 нм, размер частиц 25-28 нм); Б – HBcAg1-149-12merVRC01 (масштаб 200 нм, размер частиц 49-53 нм); В – HBcAg1-149 (масштаб 100 нм, размер частиц 19-23 нм). Негативное контрастирование уранил ацетатом.

С помощью иммунохимического анализа установлено, что МКА VRC01 взаимодействует с пептидами-имитаторами в составе HBcAg (рис. 3).



Рис. 3. Дот-блот анализ взаимодействия МКА VRC01 с HBcAg-c7cVRC01 (1), HBcAg-12merVRC01 (2), HBcAg1-149-c7cVRC01 (3), HBcAg1-149-12merVRC01 (4) и HBcAg без встройки (5)

Очищенными препаратами белков HBcAg-c7cVRC01, HBcAg-12merVRC01, HBcAg1-149-c7cVRC01 и HBcAg1-149-12merVRC01 проведена иммунизация кроликов. У иммунизированных животных проведен забор крови и получены сыворотки крови. ИФА полученных сывороток показал, что иммунизация лабораторных животных очищенными препаратами белков приводит к появлению антител, специфичных в отношении рекомбинантных иммуногенов. Средний титр после 4-й иммунизации составил 1:625000. В тесте вируснейтрализации показано (рис. 4), что иммунизация кроликов индуцирует образование вирус-специфичных антител, способных нейтрализовать env-псевдовиром SF162 (международная панель, подтип В, tier 1).

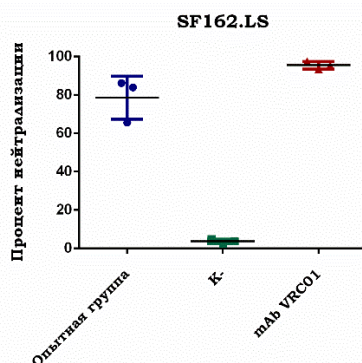


Рис. 4. Нейтрализующая активность сывороток кроликов, иммунизированных химерными вариантами НВсAg, в отношении псевдовируса – SF162.LS. В качестве положительного контроля использовалось MKA VRC01, для которого IC50 в отношении SF162.LS составило 0,1 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля (К-) использовались сыворотки контрольной группы.

Заключение

Подход, направленный на конструирование химерных вирусоподобных частиц, экспонирующих эпитопы, узнаваемые bNAbs, является одним из перспективных направлений при разработке ВИЧ-вакцин. В ходе данной работы были сконструированы рекомбинантные плазмиды, кодирующие химерные варианты НВсAg, включающие эпитопы и имитаторы эпитопа, узнаваемые антителами VRC34.01 и VRC01 соответственно. Показана иммуногенность пептидов-имитаторов эпитопа, узнаваемых антителом VRC01 в составе НВсAg. Таким образом, продемонстрирована возможность использования пептидов-имитаторов в качестве антигенных детерминант, направленных на сайты уязвимости ВИЧ-1. В дальнейшем данные пептиды-имитаторы могут быть использованы при рациональном дизайне полиэпитопных иммуногенов, включающих антигенные детерминанты из известных регионов уязвимости ВИЧ-1.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-583.2020.4 (Соглашение от 07.04.2020 г. №075-15-2020-001) и гранта РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта № 18-44-543017.

Литература

1. Рудометов А.П., Андреева Н.Б., Чикаев А.Н. и др. Антигенные свойства искусственного полиэпитопного ВИЧ-иммуногена // Сибирский научный медицинский журнал. – 2018. – Т. 38. – №. 4. – С. 37-43.
2. Рудометов А.П., Рудометова Н.Б., Зайцев Б.Н. и др. Получение химерных вариантов НВсAg, экспонирующих фрагменты МРЕР ВИЧ-1 // Сибирский научный медицинский журнал. – 2019. – Т. 39. – №. 4. – С. 55-61.
3. Рудометов А.П., Рудометова Н.Б., Щербаков Д.Н. и др. Исследование структурных и иммунологических свойств химерных белков, содержащих участки МРЕР ВИЧ-1 // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2019. – Т. 11. – №. 3 (42). – С. 56-65.
4. Щербаков Д.Н., Бакулина А.Ю., Карпенко Л.И., Ильичев А.А. Антитела, нейтрализующие широкий спектр изолятов ВИЧ-1, новая грань иммунной системы // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2015. – V. 7. – №. 4 (27).
5. Arora U., Tyagi P., Swaminathan S., Khanna N. Chimeric Hepatitis B core antigen virus-like particles displaying the envelope domain III of dengue virus type 2 // Journal of Nanobiotechnology. – 2012. – V. 10. – №. 30. – P. 1–6.
6. Bachmann M.F., Jennings G.T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns // Nature Reviews Immunology. – 2010. – V. 10. – №. 11. – P. 787-796.
7. Chikaev A.N., Bakulina A.Y., Burdick R.C. et al. Selection of peptide mimics of HIV-1 epitope recognized by neutralizing antibody VRC01 // PloS one. – 2015. – V. 10. – №. 3.
8. Eisinger R.W., Fauci A.S. Ending the HIV/AIDS pandemic // Emerging infectious diseases. – 2018. – V. 24. – №. 3. – P. 413.
9. Hessel A.J., Jaworski J.P., Epton E. et al. Early short-term treatment with neutralizing human monoclonal antibodies halts SHIV infection in infant macaques // Nature medicine. – 2016. – V. 22. – №. 4. – P. 362-368.
10. Kanekiyo M., Bu W., Joyce M.G. et al. Rational design of an Epstein-Barr virus vaccine targeting the receptor-binding site // Cell. – 2015. – V. 162. – №. 5. – P. 1090-1100.
11. Kong R., Xu K., Zhou T. et al. Fusion peptide of HIV-1 as a site of vulnerability to neutralizing antibody // Science. – 2016. – V. 352. – №. 6287. – P. 828-833.

12. Lorenzo-Redondo R., Fryer H.R., Bedford T. et al. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy // *Nature*. – 2016. – V. 530. – №. 7588. – P. 51-56.
13. Pumpens P., Grens E. The true story and advantages of the famous Hepatitis B virus core particles: Outlook 2016 // *Molecular Biology*. – 2016. – Т. 50. – №. 4. – С. 489-509.
14. Rudometov A.P., Chikaev A.N., Rudometova N.B. et al. Artificial Anti-HIV-1 Immunogen Comprising Epitopes of Broadly Neutralizing Antibodies 2F5, 10E8, and a Peptide Mimic of VRC01 Discontinuous Epitope // *Vaccines*. – 2019. – V.7.– №. 3. – P.1-18.

Сведения об ответственном авторе:

Рудометов Андрей Павлович – научный сотрудник, к.б.н. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия,
e-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru.
