

на правах рукописи

РУДОМЕТОВ АНДРЕЙ ПАВЛОВИЧ

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

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2018

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 Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные оппоненты: Дейнеко Елена Викторовна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биоинженерии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук

Кулигина Елена Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

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

Защита состоится « 26 » декабря 2018 г. в 11-00 на заседании диссертационного совета Д 208.020.02 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, Новосибирская область, тел.: +7(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 «___» _____ октября 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Н.М. Зубавичене

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Эпидемия ВИЧ-1 является одной из самых острых проблем современного здравоохранения. Согласно данным ЮНЭЙДС, 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, количество зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции в РФ к концу 2017 года составило 1 220 659 человек.

Остановить распространение ВИЧ-инфекции могло бы использование эффективной профилактической вакцины. К сожалению, по причине высокой генетической и, как следствие, антигенной вариабельности ВИЧ-1 эффективной вакцины пока создать не удалось. Решению проблемы могло бы помочь создание иммуногена, способного индуцировать антитела, обладающие вируснейтрализующей активностью против широкого спектра генетических вариантов ВИЧ-1 (bNAbs, broadly neutralizing antibodies).

Одним из подходов создания таких иммуногенов является разработка нативных тримеров поверхностных гликопротеинов ВИЧ-1. Несмотря на привлекательность данной технологии, она не лишена некоторых недостатков. Одним из них является то, что тримеры экспонируют иммунодоминантные районы, которые отвлекают адаптивный иммунный ответ от распознавания эпитопов, узнаваемых bNAbs.

Альтернативным подходом является конструирование полностью искусственных полиэпитопных ВИЧ-иммуногенов, включающих набор целевых эпитопов, собранных в одну конструкцию. Это может позволить сфокусировать иммунный ответ только на целевых детерминантах, исключив из состава вакцины нежелательные эпитопы, которые способны индуцировать аутореактивные антитела или антитела, усиливающие инфекционность вируса.

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: MPER (membrane-proximal external region) – мембрано-проксимальная наружная область gp41 ВИЧ-1, 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 ТВІ, коровый белок вируса гепатита В (НВсАg) 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 ТВІ, НВсАg и белка YkuJ.

Задачи исследования:

1. Спроектировать на основе ТВІ, НВсАg 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 nТВІ, ТВІ-MPER, НВсАg-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 (НВсАg) 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 ТВІ повышает вируснейтрализующую активность IgG у животных, иммунизированных модифицированным белком nТВІ в сравнении с исходным белком.

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. Представленные в процессе выполнения диссертационной работы результаты могут быть использованы специалистами в области конструирования искусственных белков – иммуногенов против других вирусных инфекций человека и животных.

Результаты работы, в частности иммуноген nТВІ, защищены патентом РФ.

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 bNAb VRC01, при иммунизации кроликов способен индуцировать образование антител, нейтрализующих ряд псевдотипированных штаммов ВИЧ-1.

2. Химерный белок HBcAg-mimicVRC01, экспонирующий линейный пептид-имитатор, узнаваемый bNAb 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 MPER-TbI и YkuJ-MPER индуцируют в организме лабораторных животных выработку специфичных антител к MPER региону ВИЧ-1.

Степень достоверности и апробация результатов

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

Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях, в том числе: конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов “OpenBio” (Кольцово, Россия, 2015 г.); научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе» (Новосибирск, Россия, 2016 г.); конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов “OpenBio” (Кольцово, Россия, 2016 г.); форуме «Биомедицина-2016» (Новосибирск, Россия, 2016 г.); международном научном форуме студентов и молодых ученых «Науки о жизни – от исследований к практике» (Барнаул, Россия, 2017 г.); конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов “OpenBio” (Кольцово, Россия, 2017 г.), по итогам которых опубликовано 20 тезисов.

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 научного доклада

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Раздел диссертации «Результаты и их обсуждение» представлен в виде трех частей. 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 *НВсAg*, экспонирующему пептид-имитатор эпитопа *bNAbs VRC01*. Третья – анализу антигенных и иммуногенных свойств рекомбинантных белков, несущих участки *MPER ВИЧ-1*, полученных на основе белков *YkuJ* и *TBI*.

Иммуноген nTBI

При проектировании иммуногена *nTBI* за основу был взят ранее разработанный А. М. Ерошкиным с соавт. искусственный белок *TBI*, который является компонентом кандидатной вакцины «КомбиВИЧвак». На первом этапе нами была разработана усовершенствованная система наработки рекомбинантного белка *TBI* в клетках *E. coli* путем клонирования гена *TBI* в составе вектора *pET21a*, включения последовательностей, кодирующих фрагмент (7 а.о.) белка-активатора транскрипции *InfB E. coli* и 6 остатков гистидина (6 × His), а также оптимизации кодонового состава структурной части целевого гена. Это позволило нам достичь пятикратного повышения выхода белкового продукта. Оптимизированный ген был назван *TBI_tag*.

Для улучшения иммуногенных свойств белка *TBI_tag* была проведена замена его трех В-клеточных эпитопов. Последовательности *env* (255-266) и *gag* (99-109) в белке *TBI_tag* были заменены на 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*.

Следует отметить, что нативный эпитоп VRC01 является конформационным, по этой причине был взят его линейный имитатор, полученный ранее А. Н. Чикаевым с помощью фагового дисплея. Т-хелперные эпитопы TBI-tag не подвергали изменениям, поскольку они формируют α -спиральный каркас молекулы. Модифицированный вариант белка был назван nTBI. Ген, кодирующий nTBI, также был клонирован в плазмиде pET21a в рамке считывания с последовательностью, кодирующей 6 а.о. гистидина. Размер полученного белка составляет 160 а.о., рассчитанная изоэлектрическая точка = 5,97. Блок-схемы иммуногенов TBI, TBI_tag и nTBI представлены на рис. 1.

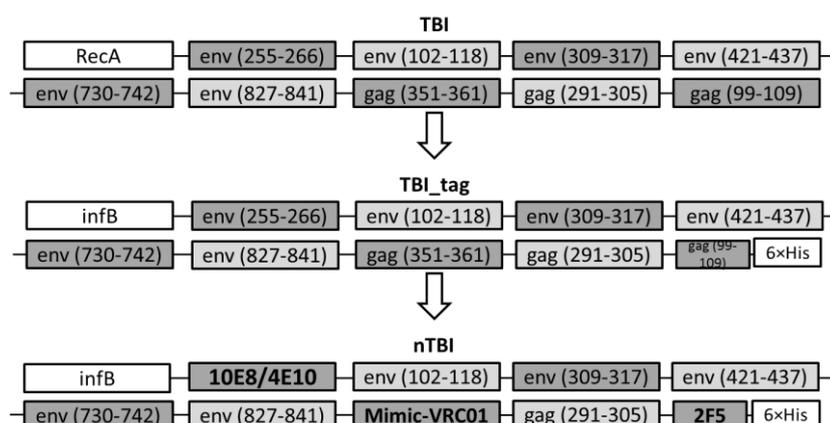


Рисунок 1 – Схематическое изображение структуры иммуногенов TBI, TBI_tag и nTBI. Темным фоном выделены В-клеточные эпитопы, светлым фоном – Тh-эпитопы. RecA – фрагмент белка *P. mirabilis* RecA. InfB – фрагмент белка-активатора транскрипции *E. coli* InfB. 6 × His – шесть аминокислотных остатков гистидина

С использованием сконструированных плазмид pET-TBI_tag и pET-nTBI были получены штаммы-продуценты рекомбинантных белков TBI_tag и nTBI на основе *E. coli* BL21 (DE3). Лизаты клеток-продуцентов представлены на электрофореграмме (рис. 2). Очистку иммуногенов проводили с использованием металл-хелатной хроматографии с последующим рефолдингом. Степень очистки TBI_tag и nTBI оценивали с помощью электрофореза в 15 % ПААГ, чистота препаратов составляла более 90 % (рис. 2).

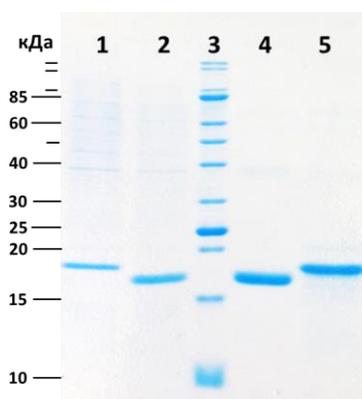


Рисунок 2 – Электрофореграмма белков TBI_tag и nTBI в 15 % ПААГ. 1 – лизат клеток *E. coli* BL21(DE3) pLysS / pET-TBI_tag после индукции ИПТГ; 2 – лизат клеток *E. coli* BL21 (DE3) pLysS / pET-nTBI после индукции ИПТГ; 3 – маркер молекулярной массы М31 (СибЭнзим, Новосибирск); 4 – очищенный белок nTBI; 5 – очищенный белок TBI_tag

Для доказательства того, что окрашенные Кумасси полосы соответствуют целевым белкам, проводили вестерн-блот анализ с использованием мышинового моноклонального антитела

(МКА) 29F2, которое распознает пептид из белка р24 ВИЧ-1, входящего как в nTbI, так и в TbI-tag. Было показано, что оба белка связываются с 29F2 (рис. 3). Для анализа антигенных свойств эпитопов, узнаваемых широконейтрализующими антителами в составе nTbI, был проведен вестерн-блот анализ с использованием МКА 10E8, 4E10, 2F5 и VRC01. Было установлено, что линейные B-клеточные эпитопы, включенные в состав nTbI, распознаются соответствующими МКА (4E10, 2F5 и 10E8), за исключением имитатора эпитопа, узнаваемого антителом VRC01 (рис. 3).

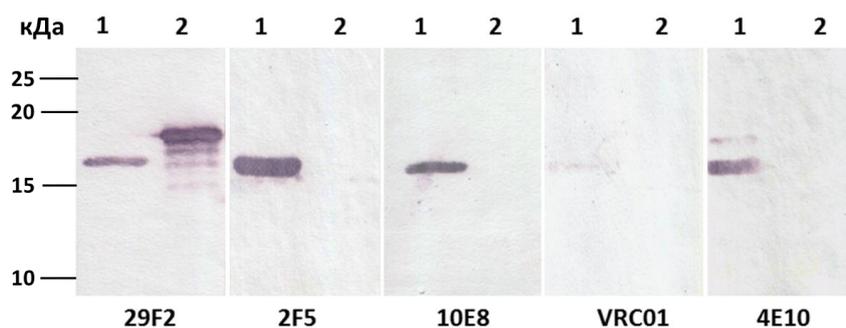


Рисунок 3 – Вестерн-блот анализ белков TbI_tag и nTbI. 1 – сорбирован белок nTbI; 2 – сорбирован белок TbI_tag. В качестве первичных антител были использованы МКА 29F2, 2F5, 10E8, VRC01 и 4E10

В случае с МКА VRC01 было выявлено, что оно значительно хуже взаимодействует с пептидом-имитатором в составе белка nTbI, чем с тем же пептидом в составе белка р3 бактериофага M13. 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.

Моделирование вторичных структур белков TbI_tag и nTbI показало, что они схожи между собой (рис. 4). Это позволило предположить, что произведенные модификации не оказывают существенного влияния на их структуру.

Экспериментальное определение вторичной структуры белков TbI_tag и nTbI проводили с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД) (рис. 5). Результаты измерения спектров КД TbI_tag и nTbI приведены в табл. 1. Спектры регистрировались в разных условиях (вода, физиологический раствор, 20 % раствор трифторэтанола). Полученные данные говорят о том, что структура белка TbI_tag подвижна в физиологических условиях. При добавлении трифторэтанола, который стабилизирует α -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.



Рисунок 4 – Аминокислотная последовательность и модель вторичной структуры белков TBI_tag и nTBI. Модели вторичных структур были получены с помощью программы 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

Таблица 1

Результаты спектроскопии КД белков TBI_tag и nTBI

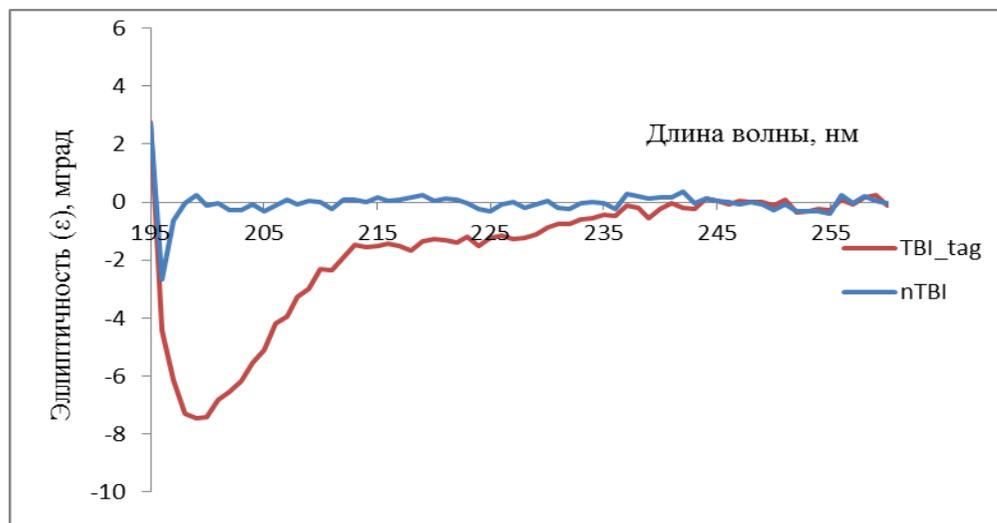


Рисунок 5 – Спектры КД белков TBI_tag и nTBI в физиологическом растворе

Структура	Образец		
	TBI_tag		
	Физ. 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 %

Для анализа иммуногенности модифицированных белков была проведена иммунизация двух групп кроликов очищенными препаратами ТВІ_tag и nТВ. Иммунизацию проводили трехкратно с интервалом в две недели, забор образцов крови проводили через две недели после последней иммунизации.

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

Образцы сывороток дополнительно анализировали с помощью иммуноблотинга на наличие специфических антител к белкам ВИЧ-1 (рис. 6). 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.

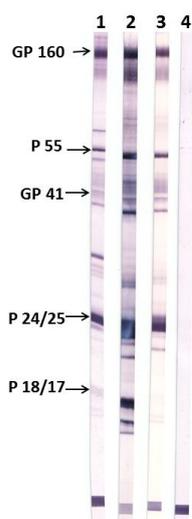


Рисунок 6 – Анализ сывороток животных, иммунизированных ТВІ_tag и nТВ, с использованием коммерческой тест-системы New Lav Blot. 1 – положительный контроль из набора New Lav Blot; 2 – сыворотки кроликов, иммунизированных ТВІ_tag; 3 – сыворотки кроликов, иммунизированных nТВ; 4 – преиммунные сыворотки кроликов из обеих групп

Было установлено, что сыворотки, полученные от кроликов, иммунизированных ТВІ_tag, содержат антитела против белков gp120, gp160, gp41, p24 (p55) и p17 ВИЧ-1, тогда как антитела, индуцированные иммунизацией кроликов nТВ, не распознают белок p17 ВИЧ-1 (рис. 6). Эти результаты подтверждают структуру иммуногенов, поскольку nТВ не несет эпитоп из p17 ВИЧ-1, который был заменен эпитопом антитела 2F5.

Для анализа вируснейтрализующей активности антител из сывороток иммунизированных животных были выделены фракции IgG, которые исследовали в реакции вируснейтрализации с использованием Env-псевдовирuсов ВИЧ-1. В реакции

вируснейтрализации использовались Env-псевдовirusы ВИЧ-1, входящие в состав референсной панели (NIH, США). На первом этапе проводили анализ с использованием легко нейтрализуемого псевдовirusа 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 (рис. 7). При этом нужно отметить, что IgG против nTBI более эффективно нейтрализовали ВИЧ-псевдовirus, 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 (рис. 7).

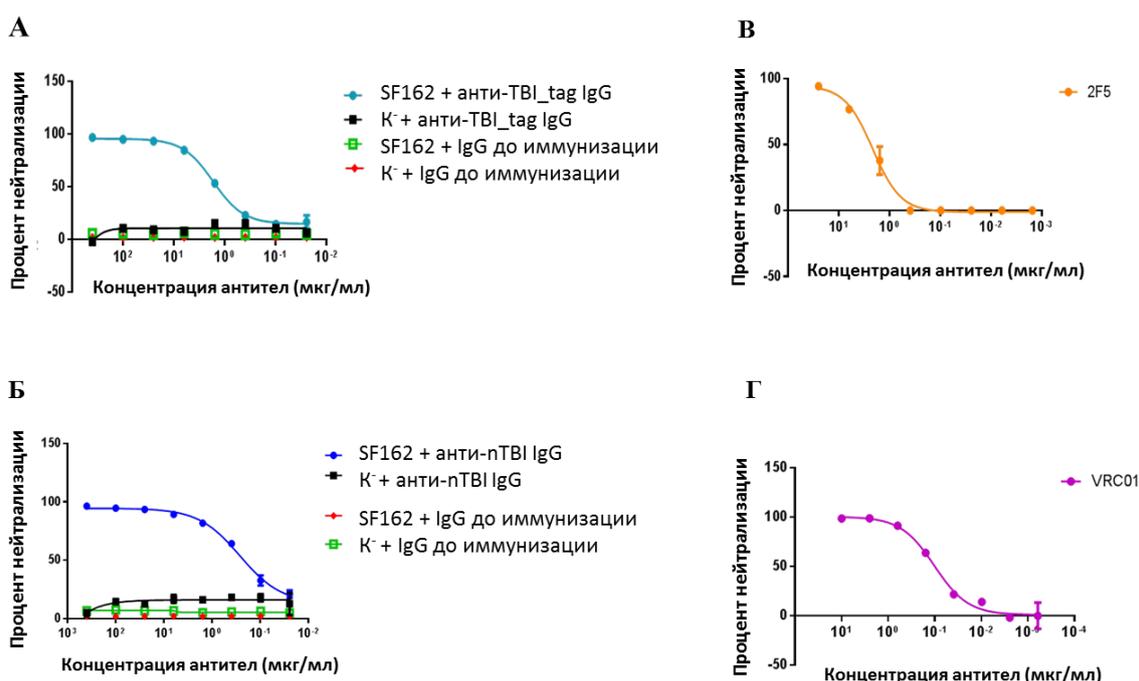


Рисунок 7 – Нейтрализующая активность IgG, выделенных из сывороток крови животных, иммунизированных белками TBI_tag и nTBI, в отношении псевдовirusа SF162.LS. Кривые нейтрализации: А – для IgG, индуцированных иммунизацией TBI_tag; Б – для IgG, индуцированных иммунизацией nTBI; В – для МКА 2F5, положительный контроль; Г – для МКА VRC01, положительный контроль. Вирусные частицы, псевдотипированные гликопротеином оболочки вируса Марбурга, использовали в качестве отрицательного контроля. Графики построены с помощью программы GraphPad Prism 6.0

На следующем этапе была определена нейтрализующая активность очищенных иммуноглобулинов по отношению к env-псевдовirusам ВИЧ-1 второго и третьего уровней устойчивости (табл. 2). Было установлено, что TBI_tag и nTBI индуцируют наработку антител с умеренной нейтрализующей активностью против штамма QH0692 (tier 2). Средние значения IC₅₀ в отношении данного псевдовirusа составили 2,63 мкг/мл для антител, индуцированных иммунизацией nTBI, и 4,46 мкг/мл для антител, индуцированных иммунизацией TBI_tag (табл. 2). IC₅₀ для МКА 2F5 составило 3,7 мкг/мл, для VRC01 – 0,1 мкг/мл в отношении QH0692, что согласуется с литературными данными.

Таблица 2

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

Псевдовирuс	Субтип	Корцептор	Уровень	*IgG TBI_tag		*IgG nTBI		bNAbs 4E10
				Процент нейтрализации (%)	* IC ₅₀ (µg/mL)	Процент нейтрализации (%)	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
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

* IgG TBI_tag и IgG 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 псевдовирюсов уровня устойчивости 2 и 3 (tier 2 и tier 3) нейтрализующая активность как анти-TBI_tag IgG, так и анти-nTBI IgG была ниже 50 %. Однако стоит отметить, что уровень нейтрализующей активности (в %) анти-nTBI антител был выше, чем анти-TBI_tag антител в отношении тестируемых псевдовирюсов (табл. 2).

Помимо псевдовирюсов, для оценки вируснейтрализующей активности антител проводили реакцию вируснейтрализации с использованием молекулярного клонa ВИЧ-1 92BR025 (субтип С, 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. При этом уровень вируснейтрализующей активности анти nTBI IgG, чем анти- TBI_tag IgG. Величина IC₅₀, 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. IC₅₀ для МКА 4E10, которое было использовано в качестве положительного контроля, составило 0,72 мкг/мл, что соответствует литературным данным.

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 псевдовирюса SF162.LS антителами против TBI_tag и против nTBI.

Пептид 10E8 показал наиболее интенсивное и воспроизводимое ингибирование нейтрализации псевдовирюса SF162.LS антителами против nTBI ($p = 0,000154$) (рис. 8), при этом ингибирование нейтрализации анти-TBI_tag данным пептидом не происходит. Как и ожидалось, пептид 10E8 блокирует нейтрализацию МКА 10E8 ($p = 0,00231$) (рис. 8). Эти результаты могут свидетельствовать о наличии во фракции IgG, выделенных из сывороток крови животных, иммунизированных nTBI, антител, специфичных к пептиду 10E8. Добавление пептидов VRC01 и 2F5 к анти-TBI и анти-nTBI антителам не приводило к достоверному ингибированию нейтрализации SF162, однако было показано, что данные пептиды ингибируют нейтрализующую активность соответствующих bNAbs.

Таким образом, в результате проделанной работы был получен белок nTBI, содержащий эпитопы, узнаваемые широконейтрализующими антителами 10E8, 4E10, 2F5, и линейный имитатор конформационного эпитопа, узнаваемого МКА VRC01. 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. Установлено, что nTbI индуцирует антитела, обладающие более высоким уровнем вируснейтрализующей активности по сравнению с антителами к TbI_tag.

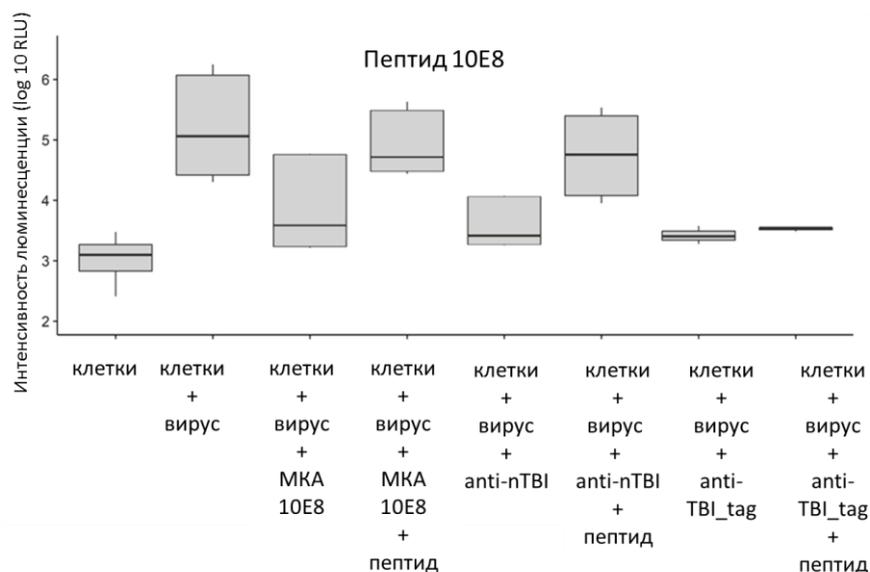


Рисунок 8 – Ингибирование вируснейтрализующей активности антител синтетическим пептидом 10E8. Реакцию вируснейтрализации проводили с использованием клеток TZM-bl и псевдовirusа SF162, к которым добавляли смесь: пептид и МКА, или пептид и анти-nTbI IgG, или пептид и анти-TbI_tag IgG. Клетки – фоновый уровень люминесценции (клетки TZM-bl); клетки + вирус – уровень люминесценции при добавлении к клеткам псевдовirusа (псевдовirus SF162 + TZM-bl). Соответствующие обозначения указаны по оси абсцисс. По оси ординат отложена интенсивность люминесценции (log10 RLU)

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

Как было показано выше, МКА VRC01 значительно хуже взаимодействует с пептидом-имитатором в составе nTbI, чем с ним же в составе белка р3 бактериофага M13. В связи с этим было решено использовать другой белок-носитель, а именно – HBcAg, который является одной из перспективных систем презентации чужеродных эпитопов. HBcAg состоит в среднем из 200 идентичных белковых субъединиц размером 21 кДа, которые обладают способностью самоорганизовываться в коровую частицу.

Ранее в лаборатории была получена плаزمидна на основе вектора pUC8, несущая ген HBcAg. Встройку олигонуклеотидного дуплекса, кодирующего пептид-имитатор антитела VRC01, проводили в область, соответствующую 81 а.о. HBcAg (район главной антигенной детерминанты кора – петля e1). В результате была получена рекомбинантная плазмидна pUC-HBcAg-mimicVRC01, кодирующая химерный белок HBcAg-mimicVRC01.

Было показано, что в клетках *E. coli* JM103, трансформированных рекомбинантной плазмидой pUC-HBcAg-mimicVRC01, синтезируется белок, по электрофоретической подвижности соответствующий теоретически рассчитанной (рис. 9 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

НВсAg. Было установлено, что МКА одинаково эффективно узнают как исходный НВсAg, так и НВсAg-mimicVRC01 (рис. 9 Б). Для анализа антигенных свойств пептида-имитатора эпитопа антитела VRC01 в составе НВсAg был проведен дот-блот анализ с использованием МКА VRC01. Было установлено, что имитатор в составе НВсAg распознается МКА VRC01 (рис. 9 В).

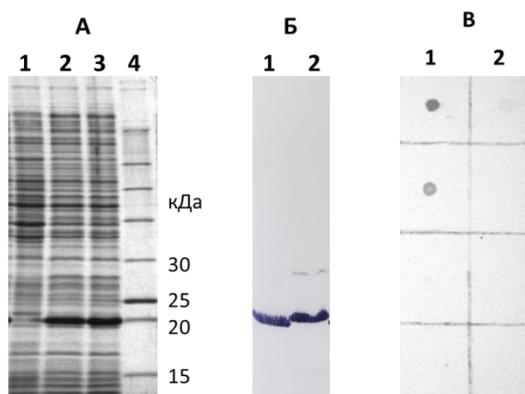


Рисунок 9 – Электрофоретический и иммунохимический анализ белков НВсAg и НВсAg-mimicVRC01. **А.** 1 – лизат культура *E. coli* JM103 без плазмиды; 2 – лизат клеток *E. coli* JM103/pUC/НВсAg-mimicVRC01; 3 – лизат клеток *E. coli* JM103/pUC/НВсAg; 4 – маркер молекулярной массы. **Б.** Вестерн-блот анализ: 1 – *E. coli* JM103/pUC/НВсAg; 2 – *E. coli* JM103/pUC/НВсAg-mimicVRC01, в качестве первичных антител использовались моноклональные антитела к НВсAg. **В.** Дот-блот анализ взаимодействия рекомбинантных белков НВсAg (1) и НВсAg-mimicVRC01 (2) с МКА VRC01

Поскольку белок НВсAg-mimicVRC01 находится в тельцах включения, 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 НВсAg и НВсAg-mimicVRC01 при гель-фильтрации выходят из колонки в свободном объеме. Это позволяет предположить, что исследуемые белки формируют частицы.

Для подтверждения того, что белки НВсAg и НВсAg-mimicVRC01 действительно образуют коровые частицы, был проведен анализ с помощью электронной микроскопии, который подтвердил формирование характерных частиц (рис. 10).

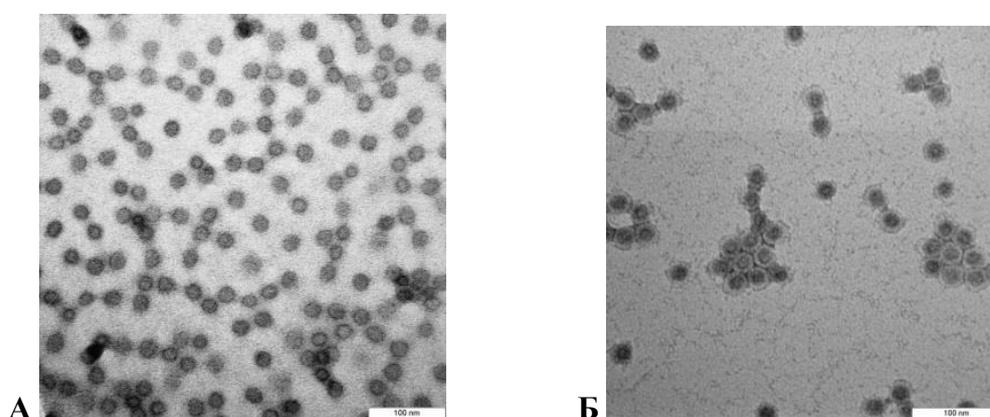


Рисунок 10 – Электронная микрофотография частиц НВсAg (А) и химерных частиц НВсAg-mimicVRC01 (Б). Негативное контрастирование – уранил ацетатом

Белками HBcAg и HBcAg-mimicVRC01 были иммунизированы две группы мышей линии BALB/c. С помощью ИФА было показано, что в сыворотках иммунизированных животных выявляются специфические антитела к рекомбинантным белкам HBcAg и HBcAg-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 HBcAg-mimicVRC01, обладают способностью нейтрализовать штамм 92BR025. При этом сыворотки животных из контрольной группы (иммунизированных HBcAg) не проявляют подобной нейтрализующей активности (рис. 11).

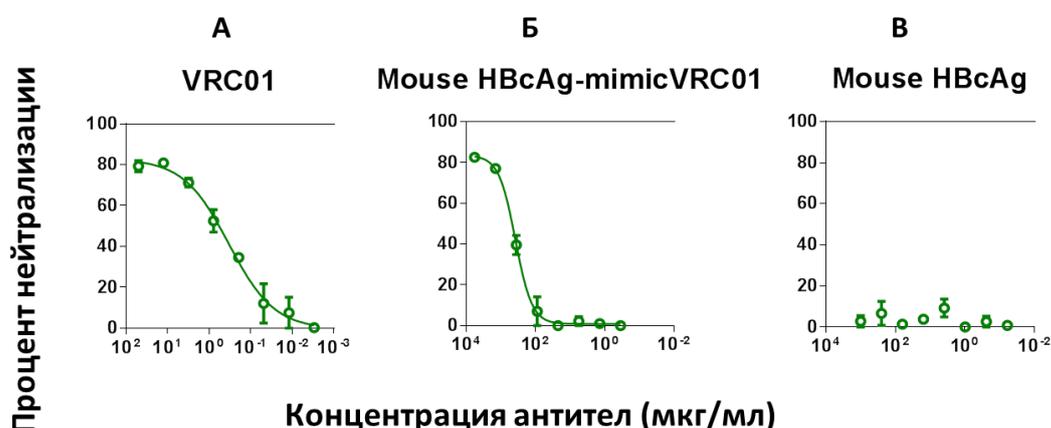


Рисунок 11 – Нейтрализующая активность IgG, выделенных из сывороток иммунизированных животных, в отношении молекулярного клона ВИЧ-1 92BR025. Кривые нейтрализации: А – для МКА VRC01, ($IC_{50} = 1,58$ мкг/мл), положительный контроль; Б – для IgG, выделенных из сывороток животных, иммунизированных HBcAg-mimicVRC01 ($IC_{50} = 487$ мкг/мл); В – для IgG, выделенных из сывороток животных, иммунизированных HBcAg (отрицательный контроль). Графики построены с помощью программы GraphPad Prism 6.0

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 р3.

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

Для конструирования иммуногенов, презентующих участки MPER региона ВИЧ-1, были выбраны белки TBI и YkuJ *Bacillus subtilis*, С- и N-концевые районы которых являются α-спиральными – структура, характерная для MPER региона.

Белок MPER-TBI

В состав белка TBI_tag было решено включить два участка MPER ВИЧ-1 (ELLELDKWASLANWFHITNLLWLK и IALLLLDAWASLWNWFDITNWLWYI) на С- и N-

конце, в состав которых входят эпитопы, узнаваемые антителами 2F5, 4E10 и 10E8. Спроектированный белок был назван МРЕР-ТВІ (156 а.о., 17,8 кДа). Блок-схема белка МРЕР-ТВІ изображена на рис. 12.

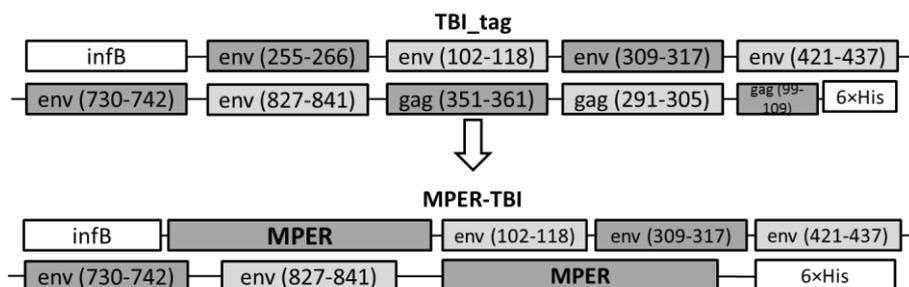


Рисунок 12 – Схематическое изображение структуры иммуногенов TBI_tag и МРЕР-ТВІ. Темным фоном выделены В-клеточные эпитопы, светлым фоном – Th-эпитопы. InfB – фрагмент белка-активатора транскрипции *E. coli* InfB. 6 × His – шесть аминокислотных остатков гистидина. МРЕР – участки мембранно-проксимальной наружной области ВИЧ-1

Для того чтобы оценить, как планируемые встройки двух фрагментов МРЕР могут повлиять на структуру искусственного белка, было проведено построение пространственной модели белка с использованием программы I-TASSER. 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. Предсказанная модель белка представлена на рис. 13.

Согласно полученной модели, N- и C-концевые участки молекулы являются α -спиральными (что соответствует структуре МРЕР региона), внутренний каркас молекулы представлен чередованием α -спиральных участков и петлевых структур (что согласуется со структурой белка ТВІ) (рис. 13).

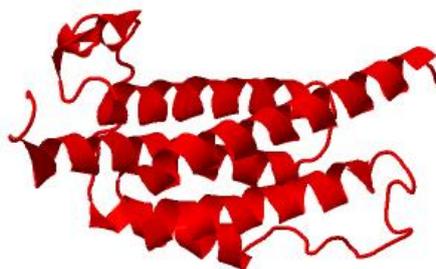


Рисунок 13 – Пространственная модель белка МРЕР-ТВІ, полученная с помощью сервиса I-TASSER

Ген, кодирующий белок МРЕР-ТВІ, был клонирован в составе плазмидного вектора рЕТ21а в рамке считывания с последовательностью, кодирующей 6 а.о. гистидина. Получение, очистка и характеристика антигенных и иммуногенных свойств белка МРЕР-ТВІ описаны в следующем разделе.

Белок YkuJ-MPER

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 (рис. 14 А) с известной третичной структурой, определенной рентгеноструктурным анализом (идентификатор PDB 2FFG). Общая длина белка YkuJ составляет 78 а.о. Ядро 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 4E10 и 10E8. Свойства белка YkuJ плохо изучены, но известно, что *B. subtilis* непатогенны для человека, что позволяет говорить о его нетоксичности.

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) (рис. 14 Б). При этом на N- и С-конец были включены участки MPER ВИЧ-1, аналогичные тем, которые были включены в MPER-TBI.

Методами молекулярного моделирования было установлено, что участки MPER, находясь на N- и С-концах белка, могут принимать конформацию, характерную для эпитопов известных моноклональных антител: 2F5 и Z13 (конформация без регулярной вторичной структуры), 4E10 и 10E8 (α -спиральная конформация).

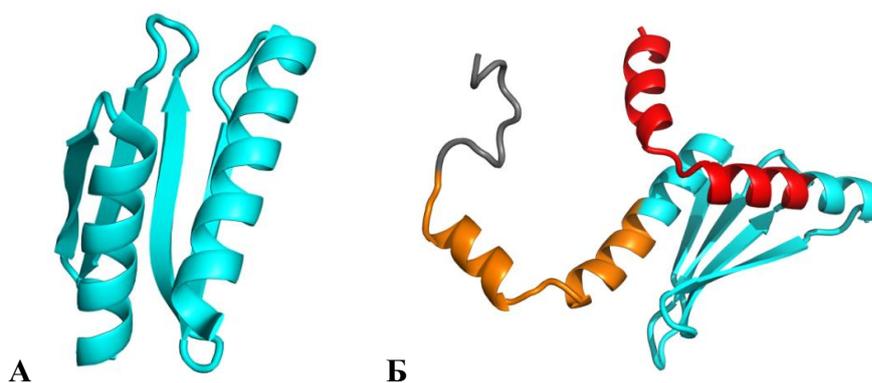


Рисунок 14 – Пространственные структуры белков YkuJ (А) и YkuJ-MPER (Б). Каркас исходного белка выделен бирюзовым, встроенные участки MPER в N-конец – красным, С-конец – коричневым, гистидиновая метка обозначена серым цветом. Модель построена с помощью программы PyMOL

Способность белка YkuJ-MPER связываться одновременно с двумя антителами без стерических проблем была подтверждена методами молекулярного моделирования (рис. 15). Согласно полученной модели, пространственная структура YkuJ позволяет встроить два участка

MPER таким образом, что антитела могут связаться одновременно с двумя районами молекулы, не мешая друг другу.

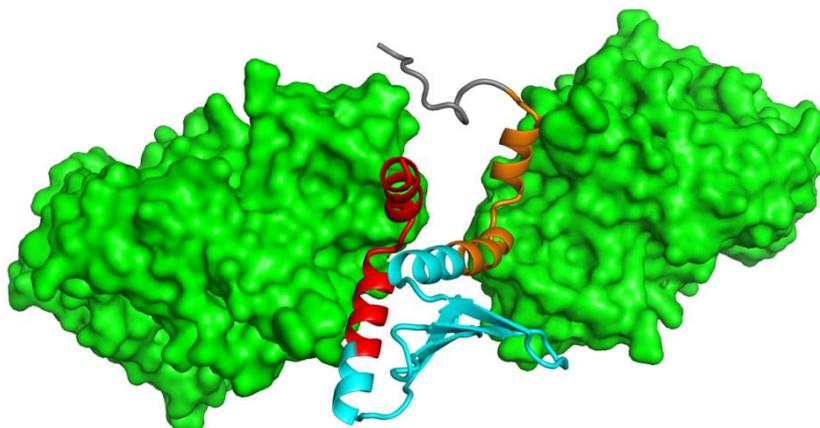


Рисунок 15 – Модель взаимодействия YkuJ-MPER с Fab-фрагментами антитела 10E8 (зеленые). Красным и коричневым цветом выделены участки MPER ВИЧ-1 в составе белка YkuJ (березовые бета-тяжи)

Спроектированный ген YkuJ-MPER был синтезирован и клонирован в составе плазмидного вектора pET21a в рамке считывания с последовательностью, кодирующей 6 а.о. гистидина. Полученные продуценты на основе *E. coli* BL21 использовались для наработки рекомбинантных белков YkuJ-MPER и MPER-Tb1. Белки очищали с помощью металл-хелатной хроматографии. Рефолдинг проводили диализом против буферов со снижающейся концентрацией мочевины. Степень очистки белков оценивали электрофорезом в 15 %-м ПААГ с последующей фиксацией и окрашиванием Кумасси G250 (рис. 16).



Рисунок 16 – Электрофореграмма белков MPER-Tb1 и YkuJ-MPER: 1 – маркер молекулярной массы М31 (СибЭнзим, Новосибирск); 2 – белок MPER-Tb1; 3 – белок YkuJ-MPER

Для исследования антигенных свойств белков YkuJ-MPER и MPER-Tb1 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 (рис. 17).

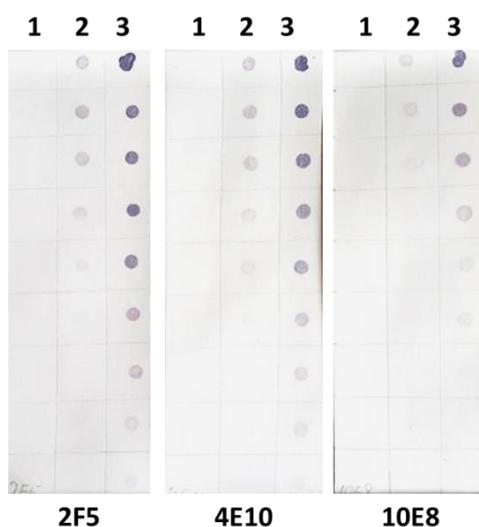


Рисунок 17 – Дот-блот анализ рекомбинантных белков с использованием МКА 2F5, 4E10 и 10E8. В качестве антигенов сорбированы: 1 – TBI_tag (контроль); 2 – MPER-TBI; 3 – YkuJ-MPER.

Вторичная структура и аминокислотная последовательность белков MPER-TBI и YkuJ-MPER, предсказанная с помощью программы PSSfinder, представлена на рис. 19. Экспериментальное определение вторичной структуры антигенов YkuJ-MPER и MPER-TBI проводили с помощью спектроскопии кругового дихроизма (рис. 18). Результаты измерения спектров КД YkuJ-MPER и MPER-TBI приведены в табл. 3. Полученные данные говорят о том, что структура MPER-TBI является в основном α -спиральной, что согласуется с теоретически предсказанной структурой исследуемого белка.

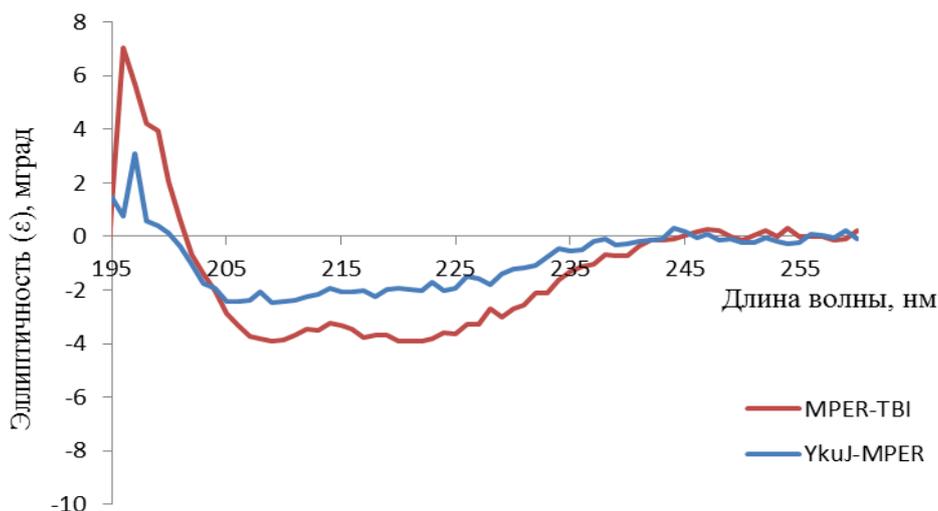


Рисунок 18 – Спектры кругового дихроизма белков YkuJ-MPER и MPER-TBI в физиологическом растворе

Согласно предсказанной модели белок YkuJ-MPER с N-концевыми районами, соответствующими эпитопам 10E8, состоит на 45 % из α -спиральных и на 24% из β -

структурных участков (рис. 19). Экспериментальное определение вторичной структуры показывает, что количество β -структуры соответствует модели, а α -спиралей заметно меньше (табл. 3). 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.

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 использовали сыворотки, полученные от кроликов до иммунизации. Было установлено, что в сыворотках крови обеих групп животных содержатся антитела, специфичные к исследуемым иммуногенам. Средние титры как анти-YkuJ-MPER, так и анти-MPER-TBI антител после четвертой иммунизации составили 1:1 000 000. Сигнал преиммунных сывороток в ИФА был на уровне фона.

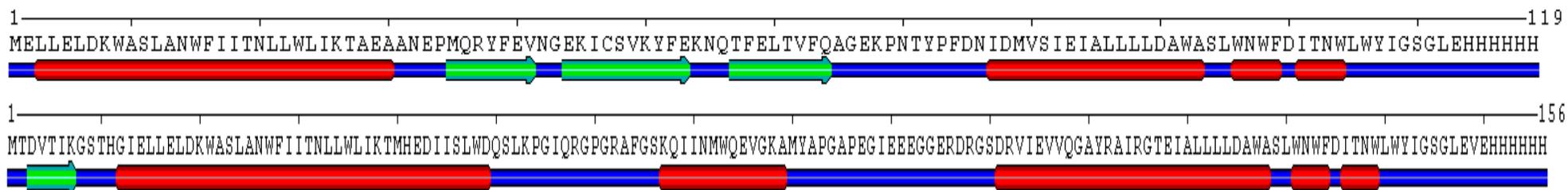


Рисунок 19 – Аминокислотная последовательность и вторичная структура белков YkuJ-MPER (сверху) и MPER-TBI (снизу). Синим цветом обозначены неформленные структуры, красным обозначены α -спирали, зеленым обозначены β -листы. Метод предсказания – PSSfinder

Таблица 3

Результаты кругового дихроизма белков YkuJ-MPER и MPER-TBI

Структура	Образец					
	YkuJ-MPER			MPER-TBI		
	Физ. раствор	20 % трифторэтанола	Вода	Физ. 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 %

Спектры кругового дихроизма белков YkuJ-MPER и MPER-TBI были получены при 25 °C 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

Для проверки способности сывороток связываться с «чужим» антигеном был проведен перекрестный ИФА (для анти-MPER-TbI в качестве антигена сорбировали белок YkuJ-MPER, а для анти-YkuJ-MPER – белок MPER-TbI). Анализ показал, что сыворотки 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 1:1 000 000; в случае, когда сорбирован антиген YkuJ-MPER, средние титры равны 1:100 000. Для группы животных, иммунизированных YkuJ-MPER, средние титры сывороток крови на антиген YkuJ-MPER равны 1:1 000 000, в случае, когда в качестве антигена сорбирован MPER-TbI титры равны 1:800 000.

С помощью тест-системы New Lav 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, узнают гликопротеины gp160 и gp41 ВИЧ-1, в состав которых входит участок MPER. Т.о., можно утверждать, что в иммунных сыворотках есть антитела, специфичные к этому региону (рис. 20).

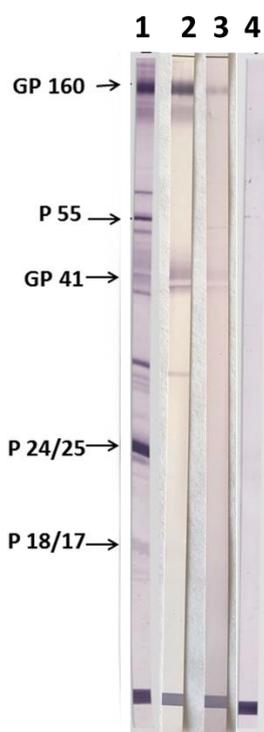


Рисунок 20 – Анализ сывороток животных, иммунизированных как MPER-TbI, так и YkuJ-MPER с использованием коммерческой тест-системы New Lav Blot. 1 – положительный контроль из набора New Lav Blot; 2 – сыворотки кроликов, иммунизированных MPER-TbI; 3 – сыворотки кроликов, иммунизированных YkuJ-MPER; 4 – преиммунные сыворотки кроликов из обеих групп

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.

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 мембранно-проксимальный регион gp41 на N- и C-концах молекулы. Согласно построенной пространственной модели, N- и C-концевые участки молекулы MPER-TBI являются α -спиральными, внутренний каркас молекулы представлен чередованием α -спиральных участков и петлевых структур. С помощью спектроскопии кругового дихроизма подтверждено, что структура MPER-TBI является преимущественно α -спиральной (доля α -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 C-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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК

1. **Рудометов А.П.**, Андреева Н.Б., Чикаев А.Н., Щербакова Н.С., Каплина О.Н., Карпенко Л.И. Антигенные свойства искусственного полиэпитопного ВИЧ-иммуногена // Сибирский научный медицинский журнал. – 2018. – Т. 38. – № 4. – С. 37–43.
2. **Рудометов А.П.**, Чикаев А.Н., Андреева Н.Б., Щербакова Н.С., Лебедев Л.Р., Каплина О.Н., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Химерный белок НВсAg, несущий миметик эпитопа, узнаваемого моноклональным антителом VRC01 // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2018. – Т. 21. – № 4. – С. 46–51.

Патенты и заявки на изобретения

3. **Рудометов А.П.**, Андреева Н.Б., Щербаков Д.Н., Карпенко Л.И., Бакулина А.Ю. Искусственный ген YkuJ-MPER, кодирующий химерный белок-иммуноген YkuJ-MPER, рекомбинантная плазмидная ДНК рЕТ21а-YkuJ-MPER, обеспечивающая экспрессию искусственного гена YkuJ-MPER, и химерный белок-иммуноген YkuJ-MPER, являющийся носителем мембранно-проксимальной области ВИЧ-1 и направленный на индукцию в организме широконейтрализующих антител / Заявка на изобретение №2017139042, приоритет от 09.11.2017.
4. Чикаев А.Н., Карпенко Л.И., **Рудометов А.П.**, Андреева Н.Б., Ильичев А.А., Щербакова Н.С. Рекомбинантный химерный полипептид – иммуноген пТВИ, обладающий способностью индуцировать антитела, нейтрализующие ВИЧ-1, и предназначенный для использования в качестве компонента вакцины против ВИЧ-1 / Патент № 2642258 РФ:МПК А61К39/12/; опубл. 24.01.2018.

Статьи в научных журналах

5. Андреева Н.Б., **Рудометов А.П.**, Бакулина А.Ю., Щербаков Д.Н. Изучение иммуногенности химерного белка, включающего эпитопы антител, нейтрализующих широкий спектр первичных изолятов ВИЧ-1 // Международный научно-исследовательский журнал. – 2017. – № 8. – С. 6–10.
6. **Рудометов А.П.**, Андреева Н.Б., Чикаев А.Н., Лебедев Л.Р., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Получение ВИЧ-1 иммуногенов на основе химерного корового белка вируса гепатита В, несущего имитаторы эпитопов, узнаваемых широконейтрализующими антителами // Сборник материалов международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции. Женщины и ВИЧ». – СПб, 2017. – С. 144–150.
7. **Рудометов А.П.**, Щербакова Н.С., Чикаев А.Н. Пептиды, узнаваемые нейтрализующими антителами против ВИЧ-1 // Ежемесячный научный журнал «Научный фонд биолог». – 2015. – № 9. – С. 26–31.

Тезисы на всероссийских и международных конференциях

8. Карпенко Л.И., **Рудометов А.П.**, Щербаков Д.Н., Чикаев А.Н., Бакулина А.Ю., Андреева Н.Б., Каплина О.Н., Ильичев А.А. Каркасные белки-иммуногены, экспонирующие имитаторы эпитопов ВИЧ-1, узнаваемых широконейтрализующими антителами // Сборник тезисов VI Международной конференции по ВИЧ/СПИДу в Восточной Европе и Центральной Азии (Москва, 18–20 апреля 2018 г.). – С. 20–21.

9. **Рудометов А.П.**, Андреева Н.Б., Бакулина А.Ю., Карпенко Л.И., Щербаков Д.Н. Анализ иммунохимических свойств химерного белка, включающего участки мембранно-проксимальной наружной области gp41 ВИЧ-1 // Сборник материалов третьей международной молодежной биотехнологической школы «Рекомбинантные белки и вакцины» (Барнаул, 11–13 сентября 2017 г.). – С. 97.
10. **Рудометов А.П.**, Андреева Н.Б., Бакулина А.Ю., Карпенко Л.И., Щербаков Д.Н. Использование глобулярного белка *Bacillus subtilis* в качестве носителя эпитопа ВИЧ-1, узнаваемого широконейтрализующим антителом 10E8 // Материалы научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе» (Новосибирск, 26–27 сентября 2016 г.). – С. 223–225.
11. **Рудометов А.П.**, Андреева Н.Б., Бакулина А.Ю., Щербаков Д.Н. Конструирование иммуногенов против ВИЧ-1, включающих эпитопы широконейтрализующих антител MPER ВИЧ-1 // Сборник тезисов III международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов “OpenBio” (Кольцово, 5–6 октября 2016 г.). – С. 286–289.
12. **Рудометов А.П.**, Андреева Н.Б., Чикаев А.Н., Карпенко Л.И., Щербаков Д.Н. Разработка ВИЧ-1 иммуногенов, направленных на индукцию широконейтрализующих антител // Материалы I международного научного форума студентов и молодых ученых «Науки о жизни – от исследований к практике» (Барнаул, 11–13 сентября 2017 г.). – С. 35.
13. **Рудометов А.П.**, Чикаев А.Н., Андреева Н.Б., Щербаков Д.Н., Каплина О.Н., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Полиэпитопный ВИЧ-1 иммуноген pTBI, содержащий эпитопы, узнаваемые широконейтрализующими антителами // Сборник тезисов VI Международной конференции по ВИЧ/СПИДу в Восточной Европе и Центральной Азии (Москва, 18–20 апреля 2018 г.). – С. 31–32.
14. **Рудометов А.П.**, Чикаев А.Н., Карпенко Л.И. Конструирование химерных частиц НВсAg, экспонирующих имитаторы эпитопа, узнаваемые широконейтрализующим антителом VRC01 // Форум «Биомедицина-2016» (Новосибирск, 26 июня – 1 июля 2016 г.). – С. 124.
15. **Рудометов А.П.**, Щербаков Д.Н., Андреева Н.Б., Бакулина А.Ю., Чикаев А.Н., Карпенко Л.И. Оптимизация структуры генов ВИЧ-иммуногенов, с целью повышения биосинтеза кодируемых белков и упрощения схемы их очистки // Сборник тезисов IV международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов “OpenBio” (Кольцово, 24–26 октября 2017 г.). – С. 94–97.
16. **Рудометов А.П.**, Щербаков Д.Н., Бакулина А.Ю. Конструирование иммуногена против ВИЧ-1, включающего эпитоп широконейтрализующего антитела 10E8 // Сборник тезисов II международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов “OpenBio” (Кольцово, 1–2 октября 2015 г.). – С. 189–191.
17. Karpenko L.I., Chikaev A.N., Bakulina A.Yu., Scherbakov D.N., **Rudometov A.P.**, Scherbakova N.S., Andreeva N.B., Ilyichev A.A. Peptide mimics of HIV-1 epitopes recognized by broadly neutralizing antibodies // Abstracts of international conference “Vaccines & Vaccination” (Moscow, 27 September – 1 October 2017). – P. 33.