

Латанова Анастасия Александровна

**СОЗДАНИЕ ПРОТОТИПА ДНК-ВАКЦИНЫ  
НА ОСНОВЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИЧ-1,  
ПОВЫШЕНИЕ ЕЁ ИММУНОГЕННОСТИ**

03.01.03 – Молекулярная биология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва - 2019

Работа выполнена в лаборатории регуляции внутриклеточного протеолиза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Научные руководители:

кандидат биологических наук  
**Стародубова Елизавета Сергеевна**  
с.н.с. лаборатории регуляции внутриклеточного протеолиза  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук

кандидат химических наук  
**Беликова-Исагулянц Мария Георгиевна**  
в.н.с. группы химии вирусных нуклеиновых кислот и белков  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии  
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные  
оппоненты:

доктор биологических наук  
**Тарантул Вячеслав Залманович**  
профессор, заведующий отделом вирусной  
и клеточной молекулярной генетики  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной генетики Российской академии наук

доктор медицинских наук  
**Апарин Пётр Геннадьевич**  
заведующий лабораторией полисахаридных вакцин  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
«Государственный научный центр «Институт иммунологии»  
Федерального медико-биологического агентства

Ведущая организация:

Федеральное государственное унитарное предприятие  
«Государственный научно-исследовательский институт  
особо чистых биопрепаратов»  
Федерального медико-биологического агентства России

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного Совета Д002.235.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32 и на сайте ИМБ РАН <http://eimb.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук

А.М. Крицын

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Инфекция, вызываемая вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), является одной из главных проблем общественного здравоохранения. К концу 2017 года в мире насчитывалось около 37 миллионов носителей ВИЧ-1, и в течение того же года было зарегистрировано около 1,8 миллиона новых случаев заражения. Антиретровирусную терапию (АРТ) получают около 21,7 миллиона людей, живущих с ВИЧ, что составляет только 60% от ВИЧ-инфицированных во всём мире. АРТ повышает качество и продолжительность жизни, но требует пожизненного применения, строгого соблюдения режима приёма и имеет ряд побочных эффектов. Помимо этого, в ходе длительного применения АРТ её эффективность может снижаться из-за появления мутаций, придающих вирусу лекарственную устойчивость (ЛУ). При накоплении вторичных компенсаторных (адаптивных) мутаций возникают эффективно реплицирующиеся, не подавляемые АРТ варианты вируса. В настоящее время до 3 (5) % первичных инфекций приходится на лекарственно устойчивые варианты ВИЧ (ЛУ ВИЧ). Большая часть препаратов АРТ направлена на обратную транскриптазу ВИЧ (reverse transcriptase, RT), и поэтому возникающие в ней мутации ЛУ представляют особую угрозу. В связи с этим необходим новый подход к терапии ВИЧ, доступный большинству ВИЧ-пациентов и позволяющий предотвратить или хотя бы затормозить развитие ЛУ. Одним из таких подходов может быть терапевтическая ДНК-иммунизация (вакцинация).

**Степень разработанности темы исследования.** ДНК-иммунизация является одним из наиболее активно разрабатываемых направлений иммунотерапии ВИЧ-1. Большинство создаваемых ДНК-вакцин против ВИЧ-1 направлено на профилактическое применение и только небольшое их число предназначено для иммунотерапии ВИЧ-инфекции. Следует отметить, что среди них нет препаратов, нацеленных на ЛУ формы вируса. Чтобы выявить параметры иммунного ответа, способные обеспечить защиту от инфекции при иммунопрофилактике или замедлить течение инфекции при иммунотерапии, в состав анти-ВИЧ ДНК-вакцин часто включают несколько генов, кодирующих как структурные, так и регуляторные белки ВИЧ. В ряде исследований у ВИЧ не-прогрессоров было показано формирование клеточного и антительного иммунного ответа к RT, являвшееся одним из факторов сдерживания инфекции. Это свидетельствует о рациональности включения RT в состав многокомпонентных ДНК-вакцин против ВИЧ. При этом необходима оптимизация RT как компонента ДНК-вакцины, с максимальным повышением её иммуногенности. Такая оптимизация требует применения ряда подходов к повышению эффективности ДНК-вакцин. Эти подходы

включают оптимизацию дизайна кодируемого ДНК-вакциной антигена и вектора, а также способов его доставки и схемы иммунизации.

**Цели и задачи исследования.** Целью настоящего исследования является создание прототипа ДНК-вакцины на основе обратной транскриптазы (RT) ВИЧ-1, включая её лекарственно устойчивые (ЛУ) формы, и повышение его иммуногенности с применением различных подходов.

В задачи работы входило:

1. Разработать дизайн плазмид, кодирующих RT дикого типа и с мутациями лекарственной устойчивости, и получить их экспериментальные образцы.
2. Охарактеризовать свойства вариантов RT, кодируемых полученными плазмидами, в культурах клеток млекопитающих.
3. Сравнить иммуногенность вариантов RT, кодируемых полученными плазмидами, на мышинной модели.
4. Оценить влияние различных условий иммунизации на иммуногенность RT, кодируемой полученными плазмидами, на мышинной модели.

**Научная новизна исследования.** В данной работе современные подходы к ДНК-иммунизации были впервые системно применены для оптимизации дизайна и доставки RT антигена с целью повышения его способности индуцировать клеточный и антительный иммунный ответ (иммуногенности). Было выявлено, что среди этих подходов наибольший вклад в иммуногенность RT внесло повышение уровня её синтеза в эукариотических клетках за счёт оптимизации нуклеотидной последовательности кодирующего её гена. Было установлено, что синтез RT вызывает окислительный стресс в клетках. Показана возможность применения лидерной последовательности неструктурного белка 1 вируса клещевого энцефалита в качестве сигнала для направления RT на секрецию, что позволило снизить уровень вызываемого RT окислительного стресса. Было выявлено, что иммунизация вариантами RT и дикого типа, и с мутациями ЛУ вызвала сходные по силе антительный и клеточный ответы. Однако при этом было показано, что использование в иммунизации RT с мутациями ЛУ приводило к частичной потере распознавания эпитопов, расположенных в участках с этими мутациями. В экспериментах *in vivo* был продемонстрирован эффекторный потенциал иммунного ответа на RT, в частности, его способность уничтожать RT-синтезирующие клетки в сайтах введения ДНК, кодирующей RT.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные данные расширяют сведения о свойствах RT как фермента ВИЧ и вакцинного антигена. В частности, было установлено, что синтез RT индуцирует в клетках окислительный стресс,

который может играть важную роль как в патогенезе вируса, так и в иммуногенности RT. В работе были созданы прототипы ДНК-вакцин на основе RT дикого типа и с мутациями ЛУ, которые обеспечивали синтез этих вариантов фермента в эукариотических клетках, а также индуцировали клеточный и антительный ответ на RT в мышинной модели. Было продемонстрировано, что индуцируемый иммунный ответ способен уничтожать клетки, синтезирующие RT и ЛУ RT, в сайте инъекции, что особенно важно для терапевтической вакцины, которая должна элиминировать клетки, инфицированные различными, в том числе, ЛУ вариантами ВИЧ. Созданные прототипы ДНК-вакцин и подобранные условия иммунизации могут быть использованы как в доклинических испытаниях на приматах, так и в дальнейших клинических исследованиях.

**Методология и методы исследования.** В работе были использованы современные методы молекулярной биологии, иммунологии и вакцинологии: генная инженерия и работа с культурами эукариотических клеток, трансфекция клеток, получение рекомбинантных белков в бактериях, измерение ферментативной активности белков, флуоресцентная микроскопия, вестерн-блот, измерение активных форм кислорода в клетке, иммунизация мышей, *in vivo* введение ДНК методом электропорации, *in vivo* детекция биолюминесценции после введения мышам репортерной ДНК-конструкции, *in vitro* оценка иммунного ответа после иммунизации – Флуороспот и Элиспот, проточная цитофлуориметрия и иммуноферментный анализ.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Разработаны прототипы ДНК-вакцины на основе вариантов RT ВИЧ-1 субтипа В: дикого типа и с мутациями лекарственной устойчивости, ферментативно активных или инактивированных, кодируемых вирусными или оптимизированными по экспрессии синтетическими генами.
2. Оптимизация кодирующей последовательности повышает уровень синтеза RT в 5 раз. Кодируемая таким синтетическим геном RT имеет внутриклеточную локализацию, процессируется протеасомой и индуцирует в клетке окислительный стресс, так же как и RT, кодируемая вирусной последовательностью.
3. Оптимизация нуклеотидной последовательности гена, кодирующего RT в составе ДНК-вакцины, значительно повышает RT-специфический клеточный и антительный иммунный ответ. Мутации, ингибирующие ферментативную активность RT, не влияют на иммунный ответ. Мутации лекарственной устойчивости в RT приводят к изменению распознавания эпитопов в участках, несущих эти мутации.
4. Добавление сигнала секреции гетерологичного белка к RT обеспечивает её выведение из клетки, повышает её устойчивость к действию клеточных протеаз и снижает

индукцию RT-специфического окислительного стресса, но не вызывает изменения силы и специфичности RT-специфического иммунного ответа.

5. Для индукции RT-специфического ответа в иммунизации мышей наиболее эффективными подходами являются двукратная иммунизация с интервалом 4 недели, введение ДНК с помощью инсулинового шприца или микроигл в сочетании с последующей электропорацией.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Основные результаты работы были опубликованы в 4 статьях зарубежных профильных рецензируемых журналов и представлены на 6 международных конференциях.

**Структура и объём работы.** Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста и включает в себя 6 таблиц и 38 рисунков. Работа содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений и список литературы, включающий 363 источника.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Дизайн вариантов RT

В работе использовали два базовых гена, кодирующих RT субтипа В. Первый ген кодировал RT ВИЧ-1 штамма HXB2 дикого типа (RT wild type, RTwt). Для получения второго гена использовали кодирующую последовательность вируса, который был выделен из крови ВИЧ-инфицированного пациента, принимающего антиретровирусные препараты, с развившейся множественной лекарственной устойчивостью (ЛУ) к нуклеозидным ингибиторам. Кодированный полученным геном белок RT1.14 (обозначение соответствовало номеру пациента) имел в аминокислотной последовательности 26 замен относительно белка RTwt, 12 из которых являются охарактеризованными мутациями лекарственной устойчивости (подчёркнуты): A64V/D69N/S70N/K72G/V77I/F79L/Y117F/F118Y/Q153M/M186V/I204V/Q209E/L216F/T217Y/K221Q/Q336L/K392Q/E401D/N462D/T470S/Y485H/L493S/A510T/Q514K/N521S/A556S. Полученные из вирусов кодирующие последовательности («вирусные» гены) обеспечивали низкий уровень синтеза белка; для их эффективного применения в ДНК-вакцинации необходимо было его повысить. Для этого последовательности генов *RTwt* и *RT1.14* оптимизировали по представленности кодонов в клетках млекопитающих и вторичной структуре мРНК, в результате получили гены *RTwt-opt* и *RT1.14-opt*. Для повышения безопасности вакцины на основе RT, являющейся вирусным ферментом, в нуклеотидные последовательности *RT* внесли

точечные замены, приводящие к заменам аминокислот в активных центрах полимеразы (D185N, D186N) и РНКазы Н (E478Q), в результате получили гены *RTwt-opt-in* и *RT1.14-opt-in*. Все полученные гены *RT* клонировали в коммерческий вектор pVax1 для эукариотической экспрессии и ДНК-иммунизации. Таким образом было получено 6 вариантов плазмид, кодирующих RT: pVaxRTwt, pVaxRTwt-opt, pVaxRTwt-opt-in, pVaxRT1.14, pVaxRT1.14-opt, pVaxRT1.14-opt-in (далее pRTwt, pRTwt-opt и т.д.). Эффективность ингибирования активностей полимеразы и РНКазы Н RT подтвердили соответствующими экспериментами на выделенных из бактерий рекомбинантных белках RT.

## **2. Синтез вариантов RT эукариотическими клетками**

Чтобы проанализировать способность полученных плазмид обеспечивать синтез белка, эукариотические клетки HeLa трансфицировали данными плазмидами и через 48 часов оценивали содержание белков RT в лизатах клеток методом вестерн-блота. Во всех пробах детектировали белок молекулярной массы 66 кДа (рисунок 1), соответствующий субъединице RT р66, а в лизатах клеток, трансфицированных плазмидами с оптимизированными по экспрессии генами *RT*, – и субъединицу р51, формирующуюся при процессинге р66 RT клеточными протеазами, составившую около 20% от количества р66 субъединицы. В лизатах клеток, трансфицированных плазмидами с вирусными генами *RTwt* и *RT1.14*, детектировали только р66 субъединицу белка; её содержание было в 5 раз меньше, чем в лизатах клеток, трансфицированных плазмидами с оптимизированными генами *RT* (рисунок 1). Содержание белков, кодируемых всеми оптимизированными по экспрессии генами *RT*, было одинаково ( $p > 0,1$ ), то есть наличие мутаций ЛУ и замен инактивации не повлияло на уровень синтеза белка RT. Таким образом, оптимизация эукариотической экспрессии генов значительно повысила уровень синтеза кодируемых ими белков RT.

## **3. Локализация и деградация RT в клетке**

Основной целью данной работы было создание ДНК-вакцинного антигена на основе RT, способного обеспечить иммунный ответ на её различные, в том числе ЛУ варианты, поэтому особый интерес представлял антиген RT1.14 с мутациями ЛУ. Локализация и путь деградации (протеолиза) белка в клетке могут влиять на его иммуногенность, поэтому на следующем этапе работы изучили эти свойства на примере RT1.14-opt-in.

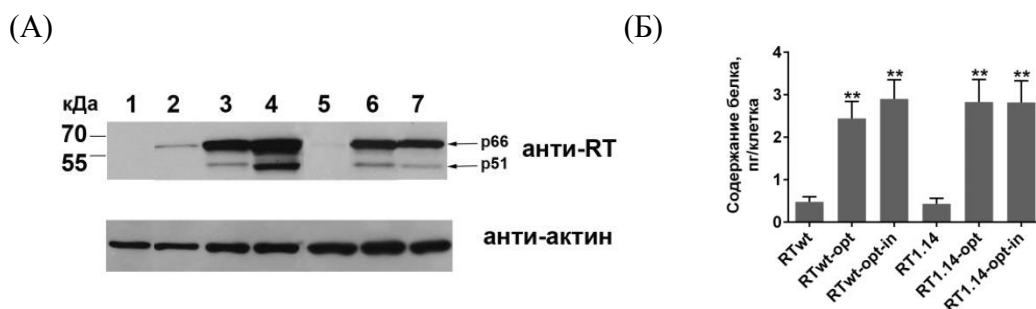


Рисунок 1. Синтез белка RT в клетках HeLa, трансфицированных плазмидами, кодирующими RT. (А) Вестерн-блот, лизаты клеток, трансфицированных pVax1 (1) и pRTwt (2), pRTwt-opt (3), pRTwt-opt-in (4), pRT1.14 (5), pRT1.14-opt (6), pRT1.14-opt-in (7); окрашивание поликлональными анти-RT антителами и антителами к  $\beta$ -актину для нормализации сигнала. Слева указано положение белковых маркеров молекулярных масс (кДа), стрелками обозначено положение p51 и p66 субъединиц RT. (Б) Среднее количество белка на клетку после трансфекции, mean+SD. \*\* $p < 0,01$  – различие между вариантами RT, не оптимизированными и оптимизированными по экспрессии.

Для изучения локализации белка RT клетки HeLa трансфицировали на покровных стеклах плазмидой pRT1.14-opt-in, на вторые сутки после трансфекции фиксировали смесью метанол:ацетон и инкубировали с поликлональными антителами к RT и соответствующими FITC-конъюгированными антителами. Полученные образцы анализировали флуоресцентной микроскопией. Белок RT1.14-opt-in имел внутриклеточное равномерное распределение в цитоплазме. Эти данные согласовывались с данными более ранних работ по локализации RT (Isaguliants и др., 2004, Стародубова и др., 2010). Подобная локализация характерна для белков, подвергающихся протеасомному процессингу и представляемых клеткам иммунной системы по пути МНС класса I.

При деградации антигена в клетке образуются антигенные пептиды, которые далее связываются с МНС класса I/II и в составе этих комплексов индуцируют ответ клеток иммунной системы. Поэтому также было важно определить путь деградации RT. Для этого оценили её подверженность протеолизу основными клеточными протеазами: клетки HeLa трансфицировали pRT1.14-opt-in, через 24 часа обрабатывали ингибиторами протеасомного и лизосомного протеолиза (рисунок 2Б), инкубировали 18 часов и лизировали. Методом вестерн-блота сравнивали количество белка RT в этих и в необработанных ингибиторами контрольных образцах. В присутствии ингибиторов протеасом содержание RT1.14-opt-in в клетках увеличилось в 2,5-3 раза; добавление лизосомных ингибиторов не повлияло на количество белка (рисунок 2А, Б). Таким образом, белок RT1.14-opt-in оказался чувствителен к действию протеасом и устойчив к действию лизосом.



Для определения времени полужизни (то есть стабильности в клетке) белка RT клетки HeLa трансфицировали плазмидой pRT1.14-opt-in, через 2 дня обрабатывали ингибитором трансляции – циклогексимидом и лизировали через 0, 2, 4, 6 часов после обработки. Количество недеградировавшего белка RT определяли методом вестерн-блота (рисунок 2В, Г). Время полужизни RT1.14-opt-in составило 2 часа. Ранее то же было показано для белка RT1.14 без замен инактивации, т.е. внесение этих замен не изменило скорость деградации белка. Таким образом, было показано, что RT1.14 ВИЧ-1 локализуется внутри клетки, имеет время полужизни 2 часа и деградируется протеасомой. Антигенные пептиды, полученные в результате деградации RT, могут в составе МНС класса I активировать CD8+ Т-клетки.

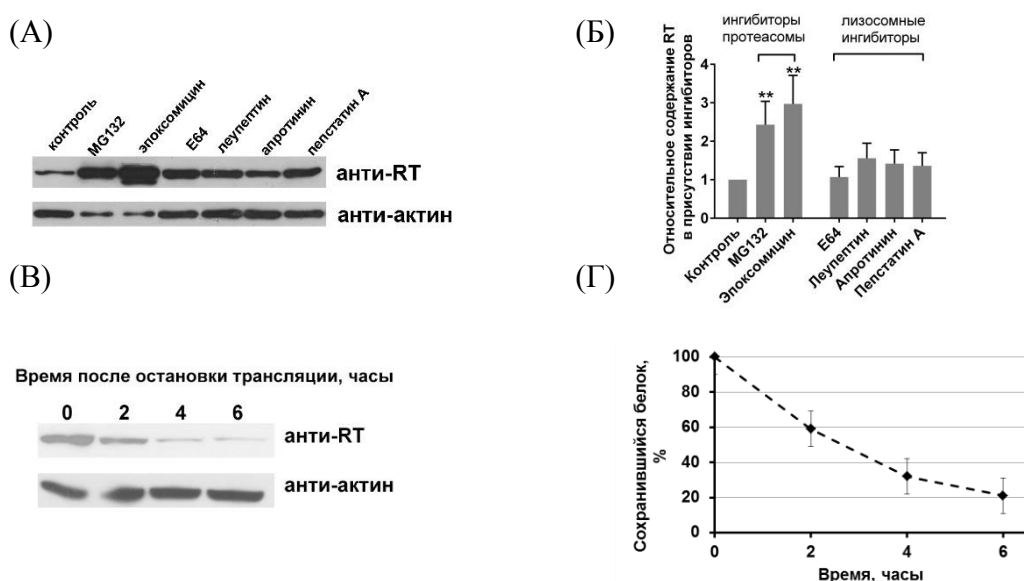


Рисунок 2. Протеолиз RT ВИЧ-1 в эукариотических клетках. Клетки HeLa трансфицировали pRT1.14-opt-in, обрабатывали ингибиторами протеасом и лизосом (А, Б) или циклогексимидом (В, Г) и лизировали через 18 (А, Б) или 0, 2, 4, 6 часов (В, Г). (А, В) Вестерн-блоты, окрашивание антителами, как это указано в подписи к рисунку 1. (Б) Относительное содержание белка RT1.14-opt-in в клетках, обработанных ингибиторами; \*\* $p < 0,01$  – различие с образцами, необработанным ингибиторами. (Г) Диаграмма скорости распада RT1.14-opt-in, mean  $\pm$  SD.

#### 4. Окислительный стресс, вызываемый при синтезе RT в клетках

Синтез в клетках некоторых белков ВИЧ-1 (gp120, Tat, Vpr, Nef) приводит к образованию активных форм кислорода (АФК) и хроническому окислительному стрессу (Ivanov и др., 2016), который может негативно влиять на иммунный ответ. Чтобы выяснить, обладает ли таким свойством RT, клетки HEK293T трансфицировали плазмидами, кодирующими белки RTwt, RT1.14, RT1.14-opt и RT1.14-opt-in, и измеряли

уровень АФК в присутствии 2,7'-дихлородигидрофлуоресцеина. Результаты представляли как уровень АФК относительно контрольных образцов, трансфицированных вектором («АФК»), а также как АФК на единицу белка RT по вестерн-блоту («АФК/RT»). В клетках, трансфицированных RT-кодирующими плазмидами, уровень АФК был в 7-9 раз выше, чем в контрольных образцах. Белки RTwt и RT1.14, кодируемые вирусными генами, индуцировали более низкие уровни АФК, чем белки RT1.14-opt и RT1.14-opt-in, однако уровни АФК/RT при синтезе этих белков оказались на порядок выше ( $p < 0,01$ , рисунок 3). Таким образом, значительный уровень окислительного стресса в клетках был индуцирован RT даже при низких уровнях её синтеза – при трансфекции плазмидами, содержащими вирусные гены *RT*. Интересно, что увеличение содержания белков RT при оптимизации последовательности генов *RT* лишь незначительно усиливало окислительный стресс.

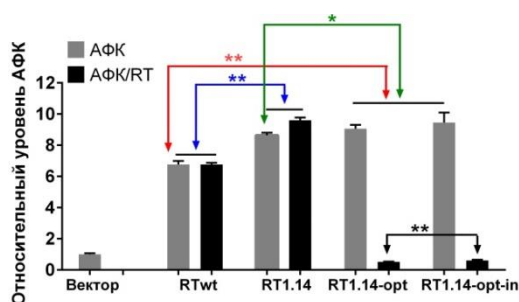


Рисунок 3. Индукция окислительного стресса в клетках HEK293T, трансфицированных RT-кодирующими плазмидами. Mean+SD, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Возможный негативный эффект окислительного стресса при синтезе RT можно нейтрализовать, если сделать RT секретiruемой. Секретiruемые белки процессируются эндосом-лизосомной системой до пептидов, которые в комплексе с молекулами МНС класса II активируют CD4<sup>+</sup> Т-клетки. Наличие ВИЧ-специфических CD4<sup>+</sup> Т-клеток является фактором эффективной защиты от ВИЧ. Поэтому следующей задачей было получение плазмиды, кодирующей секретiruемую форму RT.

## 5. RT с сигналом секреции (RT1.14-oil)

В качестве сигнала секреции использовали лидерную последовательность (Ld) гетерологичного неструктурного белка 1 (Ld NS1) вируса клещевого энцефалита длиной в 25 а.о. (аминокислотных остатков), необходимую для его транспорта в ЭПР и секреции (Fan и др, 1990). Ld NS1 клонировали в pRT1.14-opt-in, получив плазмиду pRT1.14-oil (optimized inactivated leader sequence), кодирующую RT с сигналом секреции на N-конце.

Её свойства сравнивали со свойствами RT без сигнала при трансфекции клеток плазмидами pRT1.14-opt-in и pRT1.14-oil.

По результатам вестерн-блота, лизаты клеток, трансфицированных pRT1.14-oil, содержали белки с молекулярными массами субъединиц RT – 66 и 51 кДа (рисунок 4), белка 66 кДа было приблизительно в 1,4 раза больше ( $p < 0,05$ ), чем в лизатах клеток, трансфицированных pRT1.14-opt-in (рисунок 4). Также в клетках, трансфицированных pRT1.14-oil, детектировали продукты с массой более 170 кДа, специфически окрашиваемые RT-антителами. Это могли быть ковалентно сшитые агрегаты белка, образованные в результате значительного увеличения внутриклеточного содержания RT. Перед получением клеточных лизатов отбирали культуральные жидкости клеток и также проанализировали содержание в них белка RT методом вестерн-блота. Через 48 часов после трансфекции клетки, трансфицированные pRT1.14-opt-in, и их культуральные жидкости содержали приблизительно одинаковое количество белка, в то время как белок RT1.14-oil детектировали преимущественно в культуральных жидкостях (около 75% от общего количества белка). Таким образом, добавление Ld NS1 к RT привело к секреции RT. Интересно, что RT без сигнала секреции также присутствовала в культуральных жидкостях, хотя в меньшем количестве, чем белок с сигналом. Этот феномен требует дальнейшего исследования.

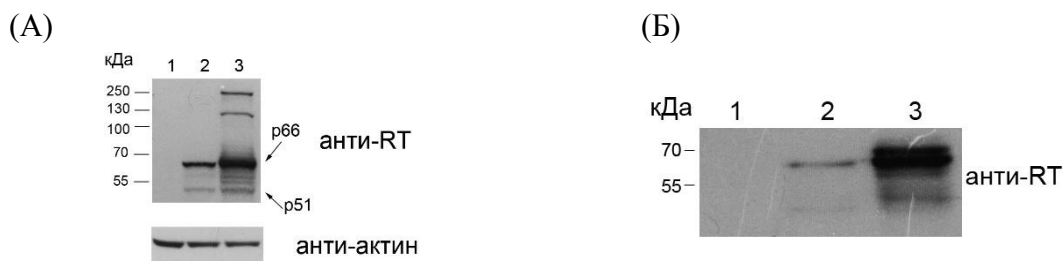


Рисунок 4. Синтез RT1.14-oil в трансфицированных клетках HeLa. (А) Вестерн-блот лизатов (А) и культуральных жидкостей (Б) клеток, трансфицированных pVax1 (1), pRT1.14-opt-in (2) и pRT1.14-oil (3). Окрашивание антителами, как это указано в подписи к рисунку 1. Слева даны позиции белковых маркёров молекулярных масс (кДа).

Белок RT1.14-oil, в отличие от RT1.14-opt-in, имел гранулярное распределение в клетке; на поверхности клеток детектировали гранулы, специфические окрашиваемые антителами к RT (рисунок 5А, белые стрелки). Также изучили поверхностную локализацию RT1.14-opt-in и pRT1.14-oil. Только на поверхности pRT1.14-oil-трансфицированных клеток детектировали специфически окрашиваемые частицы (рисунок 5Б, В), которые могли быть агрегатами белка RT, детектированными вестерн-блотом на уровне выше 170 кДа (рисунок 4А). Таким образом, RT1.14-oil локализовалась

как внутри клеток (видимо, в секреторных везикулах), так и на клеточной поверхности и в виде гранул в межклеточном пространстве, что также подтверждает её секрецию.

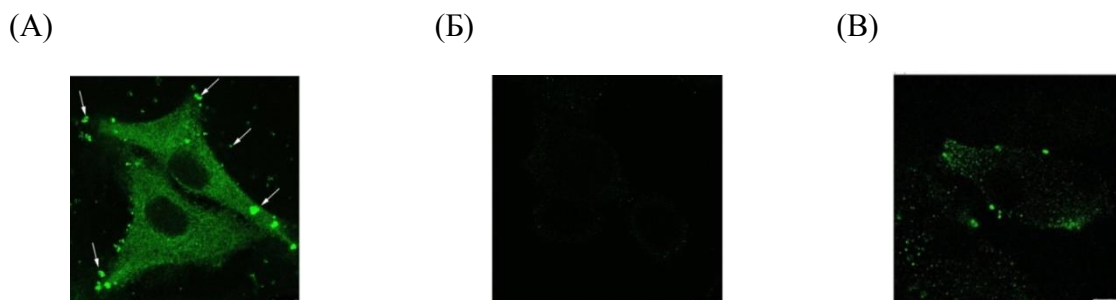


Рисунок 5. Локализация RT1.14-oil в трансфицированных клетках HeLa. (А) Локализация RT1.14-oil в клетке. (Б, В) Поверхностная локализация RT1.14-opt-in (Б) и RT1.14-oil (В). Масштабная метка на (В) в правом нижнем углу соответствует 10 мкм.

Добавление к белку сигнала секреции могло изменить путь его процессинга. Действительно, содержание RT1.14-oil, в отличие от RT1.14-opt-in, существенно не изменялось при воздействии на клетку как лизосомных, так и протеасомных ингибиторов (рисунки 2А, Б, 6А, Б). Время полужизни RT1.14-oil составило более 8 часов (около 15 часов; рисунок 6В, Г). Таким образом, в отличие от RT1.14-opt-in (Рисунок 2В, Г), RT1.14-oil являлась долгоживущим белком, устойчивым к действию клеточных протеаз и накапливающимся как в клетке, так и вне клетки (рисунок 4), предположительно, за счёт попадания белка в секреторные везикулы

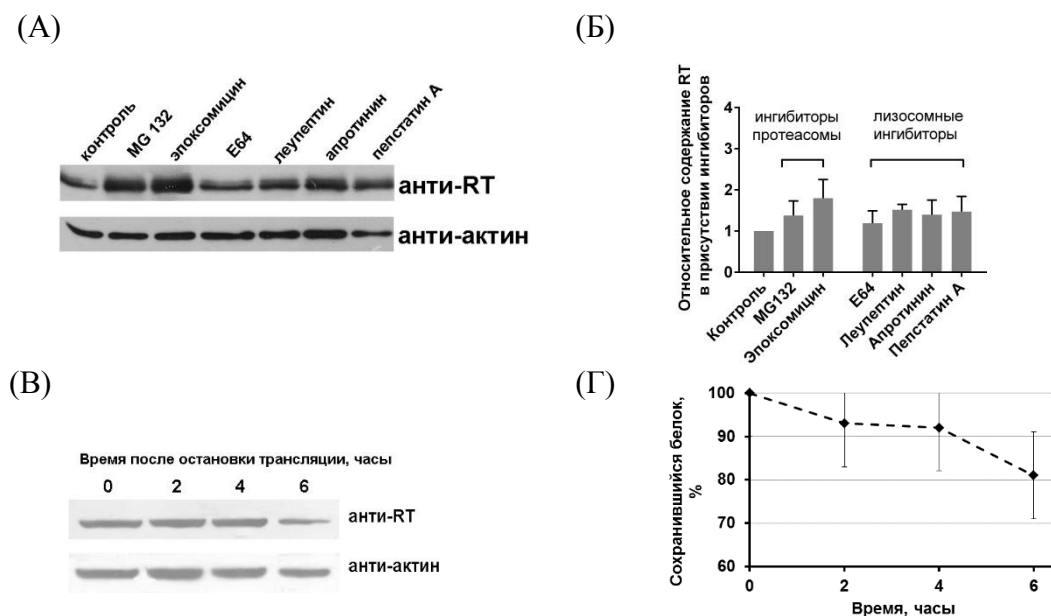


Рисунок 6. Деградация RT1.14-oil в клетках HeLa. Клетки трансфицировали рRT1.14-oil и обрабатывали ингибиторами, как это указано в подписи к рисунку 3. (А, В) Вестерн-блоты, окрашивание антителами, как это указано в подписи к рисунку 1. (Б) Относительное содержание RT1.14-oil в клетках, обработанных ингибиторами. (Г) Диаграмма скорости распада RT1.14-oil. Mean±SD.

В завершение данного этапа работы проанализировали, снижает ли секреция RT индукцию окислительного стресса в трансфицированных клетках. В pRT1.14-oil-трансфицированных клетках наблюдали тенденцию к снижению образования АФК, а при сравнении уровней АФК в пересчете на единицу белка RT (АФК/RT) – статистически значимое снижение (рисунок 7). Уровень окислительного стресса снизился, однако оставался значительным. Таким образом, синтез всех исследуемых в данной работе вариантов белков RT активировал в клетках окислительный стресс, вне зависимости от их локализации, наличия мутаций ЛУ и уровня ферментативной активности. Механизм индукции окислительного стресса при синтезе RT требует дальнейшего изучения.

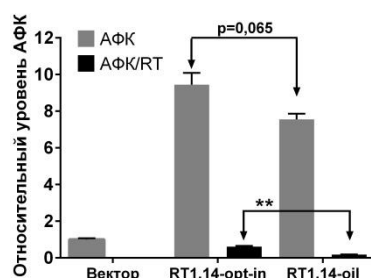
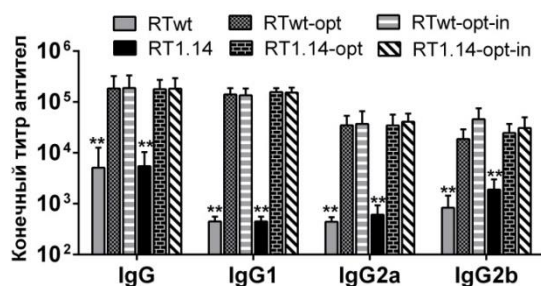


Рисунок 7. Индукция окислительного стресса в клетках HEK293T, трансфицированных pRT1.14-opt-in и pRT1.14-oil. Mean+SD, \*\* $p < 0,01$ , тенденции к различию показаны на диаграмме.

## 6. Иммуногенность RT при ДНК-иммунизации мышей

Плазмидами, кодирующими охарактеризованные варианты RT, иммунизировали самок мышей линии BALB/c. Иммунизации проводили в стандартных условиях: ДНК в PBS вводили внутрикожно инсулиновым шприцем с 29G иглой в два сайта у основания хвоста, с последующей электропорацией на устройстве Dermavax с многоигольчатыми электродами. На 21 день после иммунизации анализировали антительный и клеточный ответ к RT. В сыворотке крови определяли содержание анти-RT антител методом непрямого ИФА на планшетах, покрытых RTwt и RT1.14 белками. Иммунизация плазмидами с вирусными генами RT индуцировала титры суммарных IgG около 2000-5000, а их субтипов – порядка 400-2000. При иммунизации плазмидами с оптимизированными по экспрессии генами RT титры антител IgG (суммарных и их субтипов) возросли в десятки раз ( $p < 0,01$ ; рисунок 8А, Б). При этом сыворотки мышей, иммунизированных диким и ЛУ вариантами RT, одинаково распознавали RTwt и RT1.14 белки: титры антител, вырабатываемых к идентичному белку RT (использованному в ДНК-иммунизации), не отличались от титров антител к гомологичному белку RT ( $p > 0,1$ ; рисунок 8А, Б). Ингибирование активности RT не повлияло на её способность к индукции антительного ответа.

(A)



(Б)

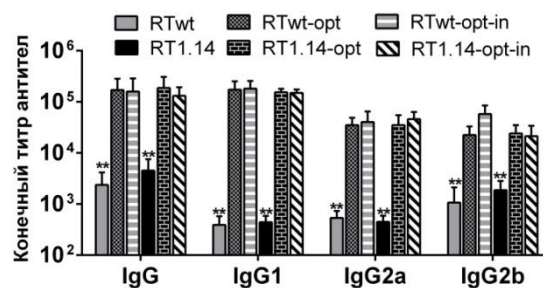
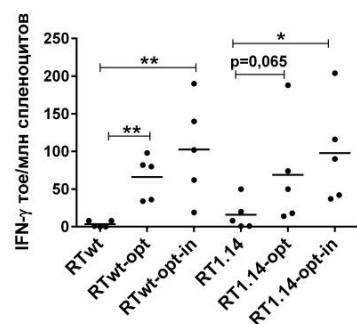


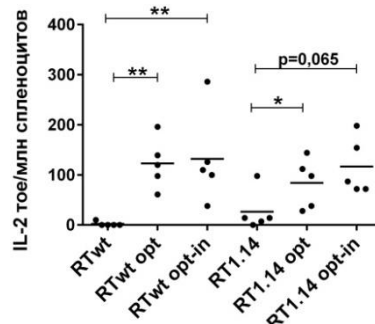
Рисунок 8. Реактивность анти-RT антител мышей после иммунизации. (A) Титры антител на RTwt после иммунизации pRTwt-вариантами и на RT1.14 после иммунизации pRT1.14-вариантами (распознавание «идентичного» варианта RT). (Б) Титры антител на RT1.14 после иммунизации pRTwt-вариантами и на RTwt после иммунизации pRT1.14-вариантами (кросс-распознавание RTwt vs RT1.14). Mean+SD, \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . На (A, Б) \*\* – различия между pRTwt и pRTwt-opt/pRTwt-opt-in иммунизациями и между pRT1.14 и pRT1.14-opt/pRT1.14-opt-in иммунизациями.

Клеточный ответ на RT оценивали в спленocyтaх по их распознаванию пептида, представляющего а.о. RT 528-543 (RT528-543). Этот пептид является CD4+Т-клеточным эпитопом, распознаваемым мышами линии BALB/с. Факт иммунного распознавания фиксировали по выработке спленocyтaми, стимулированными *in vitro* RT528-543, цитокинов IFN- $\gamma$  и IL-2 (тест IFN- $\gamma$ /IL-2 Флуороспот). При иммунизации плазмидами, несущими вирусные гены *RT*, уровни продукции IFN- $\gamma$  и IL-2 были низкими (рисунок 9). Иммунизация плазмидами с оптимизированными по экспрессии генами *RT* привела к значительному повышению уровня продукции IFN- $\gamma$ , IL-2 и одновременной продукции IFN- $\gamma$ /IL-2 (рисунок 9).

(A)



(Б)



(B)

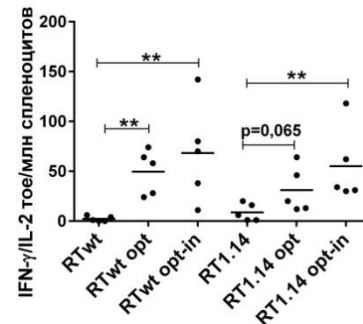


Рисунок 9. Продукция IFN- $\gamma$ /IL-2 спленocyтaми мышей, иммунизированных RT-кодирующими плазмидами, в ответ на стимуляцию пептидом RT528-543. Количество клеток на млн спленocyтaх, секретирующих IFN- $\gamma$  (A), IL-2 (Б), IFN- $\gamma$ /IL-2 (B) (точкообразующие единицы (тое)). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , тенденции к различиям указаны на диаграмме.

Таким образом, иммунизация плазмидами, содержащими оптимизированные по экспрессии гены *RT*, повысила как клеточный, так и антительный иммунный ответ на *RT* и её ЛУ варианты. При этом, в отличие от более ранних наблюдений, внесение замен инактивации в *RT*, необходимых для безопасности вакцины, не привело к снижению иммуногенности *RT*.

В отдельном эксперименте таким же образом оценили иммуногенность *RT* с сигналом секреции (*RT1.14-oil*). В ряде проведенных ранее исследований добавление сигнала секреции повышало антительный ответ, однако в данной работе титры антител у мышей, иммунизированных *pRT1.14-opt-in* и *pRT1.14-oil*, не различались. Возможно, что даже небольшое количество *RT* без сигнала секреции вне клетки (рисунок 4Б) индуцирует сильный антительный ответ, и дальнейшее увеличение количества внеклеточной *RT* за счёт секреции его не усиливает. Различий в клеточном ответе на секретируемый и несекретируемый варианты *RT* также не выявили. Таким образом, секреция *RT* несколько снизила уровень окислительного стресса, но не привела к усилению *RT*-специфического иммунного ответа, поэтому в дальнейшем в исследовании использовали экспрессионно оптимизированные синтетические гены *RTwt-opt-in* и *RT1.14-opt-in*.

## **7. *In vivo* мониторинг иммунного ответа при иммунизации *RT*-кодирующими плазмидами**

Индукция антител и продукции цитокинов в ответ на иммунизацию *RT*-кодирующими плазмидами напрямую не характеризует эффекторный потенциал иммунного ответа – его способность уничтожать клетки, синтезирующие вирусные белки. Эта способность иммунного ответа необходима для защиты от ВИЧ-инфекции и принципиальна для эффективных противовирусных вакцин, в том числе терапевтических.

В данной работе протестировали эффекторный потенциал иммунного ответа в эксперименте с совместной иммунизацией мышей *RT*-кодирующими плазмидами в смеси с плазмидой, кодирующей репортер (люциферазу, *Luc*). При введении мышам субстрата *Luc*, люциферина, по биолюминесценции можно оценить продукцию *Luc* в сайтах инъекции и таким образом оценить количество клеток, синтезирующих *Luc*. Ранее было показано, что при такой схеме иммунизации уровень биолюминесценции начинает стремительно убывать после первых семи дней. Если же с плазмидой, кодирующей репортер, вводят плазмиду, не кодирующую антиген (вектор), уровень биолюминесценции снижается достоверно медленнее. Падение биолюминесценции свидетельствует об уничтожении *Luc*-синтезирующих клеток иммунным ответом, индуцированным при иммунизации (Roos и др., 2009). Поскольку репортер *Luc* слабо

иммуногенен, основной иммунный ответ направлен на антиген и уничтожает клетки, продуцирующие антиген, а также клетки, одновременно продуцирующие антиген и репортер (Roos и др., 2009; Petkov и др., 2013). Во втором случае фиксируется падение биолуминесцентного сигнала в сайте ДНК-иммунизации. Таким образом, данный метод позволяет оценить эффекторный потенциал иммунного ответа на антиген в живых животных. Чтобы сравнить эффективность иммунного ответа на RT-кодирующие плазмиды, мышам иммунизировали в стандартных условиях этими плазмидами, а также pVax1 (вектором), которые вводили в смеси с плазмидой pVaxLuc, кодирующей Luc (далее pLuc). На 1, 3, 9, 15, 21 дни после иммунизации мышам вводили люциферин и регистрировали биолуминесценцию на приборах Spectrum. Уровень биолуминесценции снижался статистически значимо при иммунизации смесью pLuc и плазмид с оптимизированными по экспрессии генами *RT*, по сравнению с иммунизацией смесью pLuc и вектора, особенно резко – на 15 день после иммунизации ( $p < 0,01$  – различие между RTwt и RTwt-opt/RTwt-opt-in и между RT1.14 и RT1.14-opt/RT1.14-opt-in, рисунок 10). При иммунизации плазмидой pRT1.14-oil наблюдали сходную динамику биолуминесценции. Иммунизация смесью pLuc и плазмид с вирусными генами *RT* снижала биолуминесценцию незначительно, то есть вырабатываемый иммунный ответ имел низкий эффекторный потенциал. Таким образом, иммунизация плазмидами с экспрессионно оптимизированными генами *RT* индуцировала масштабное уничтожение клеток в сайте инъекции (на 15 день), то есть вызывала эффективный эффекторный иммунный ответ.

## **8. Влияние условий иммунизации на иммуногенность RT**

Оптимизация экспрессии гена усилила антительный и клеточный ответ на RT, но общий уровень иммунного ответа оставался невысоким, в сравнении с иммунным ответом на ДНК-вакцины, используемые в клинических испытаниях. Иммунный ответ на ДНК-вакцины может быть усилен за счет оптимизации условий ДНК-иммунизации. Поэтому параллельно с оптимизацией дизайна антигена RT в настоящей работе проанализировали влияние на иммуногенность условий иммунизации на примере плазмид pRTwt-opt-in и pRT1.14-opt-in, кодирующих антигены RT, сочетающие оптимальный уровень синтеза и безопасности со способностью к индукции иммунного ответа.



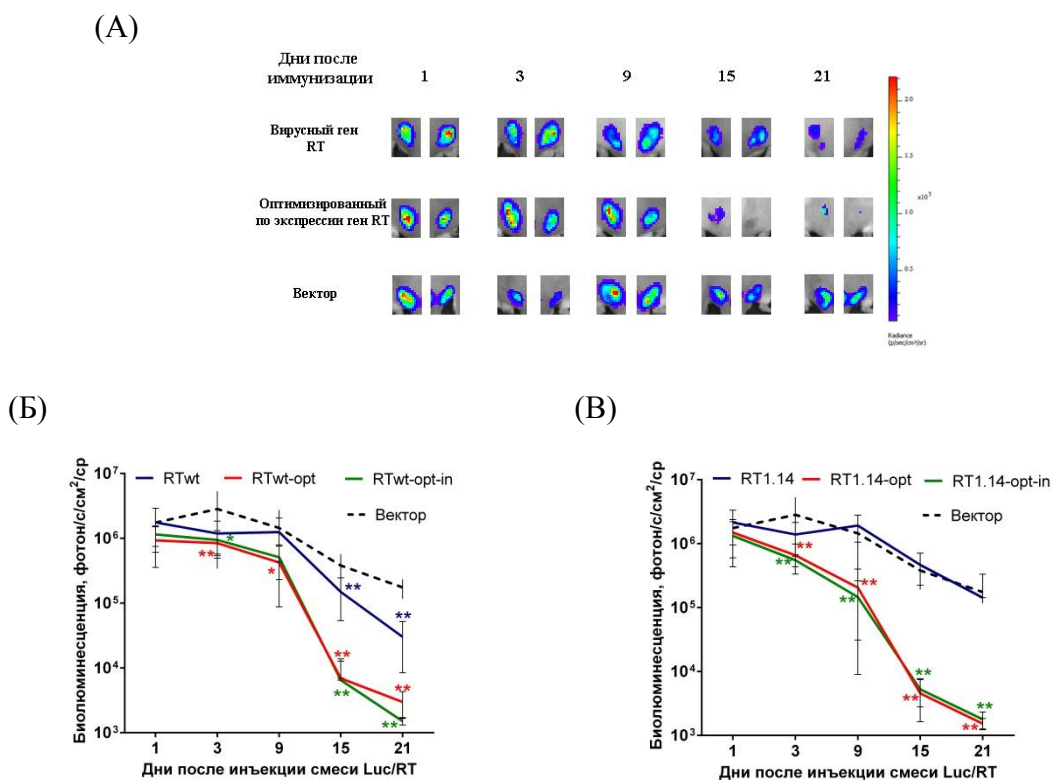


Рисунок 10. Динамика биолюминесценции в сайтах инъекции смесью плазмид, кодирующих Luc и pRTwt, pRTwt-opt, pRTwt-opt-in (Б) или pRT1.14, pRT1.14-opt, pRT1.14-opt-in (В). (А) Визуализация биолюминесценции в сайте инъекции; представлено по одной мыши из групп, иммунизированных pRTwt, pRTwt-opt-in, pVax1; справа показана шкала биолюминесценции (фотон/с/см<sup>2</sup>/ср). (Б,В) Средняя величина потока фотонов в сайте инъекции (2 сайта на мыш), mean±SD. \*p<0,05, \*\*p<0,01. На (Б, В) \*, \*\* указывают различия между иммунизациями вектором pVax1 и pRT; цвет \* совпадает с цветом кривой.

### 8.1. Повторная иммунизация

Мышей иммунизировали pRTwt-opt-in и pRT1.14-opt-in двукратно с интервалом 4 недели в стандартных условиях и на 21 день после окончания иммунизации оценивали RT-специфический иммунный ответ в сыворотках и спленocyтaх. В сравнении с однократной иммунизацией, двукратная иммунизация повысила в 2-3 раза титры анти-RT антител субтипов IgG и IgG2a у мышей, иммунизированных pRTwt-opt-in и pRT1.14-opt-in, и в 2 раза – титры анти-RT антител субтипа IgG2b у мышей, иммунизированных pRTwt-opt-in (рисунок 11А). Также несколько возросла RT-специфическая продукция IL-2 и IFN-γ/IL-2 (особенно в иммунизации pRT1.14-opt-in), но не продукция IFN-γ (рисунок 11 Б, В). Оценили и кросс-распознавание гомологичных белков: RT1.14 и RTwt спленocyтaми pRTwt-opt-in- и pRT1.14-opt-in-иммунизированных мышей, соответственно.

Варианты белка RT, как идентичный, так и гомологичный антигену RT, кодируемому плазмидой, распознавались одинаково ( $p>0,1$ ) (данные не приведены).

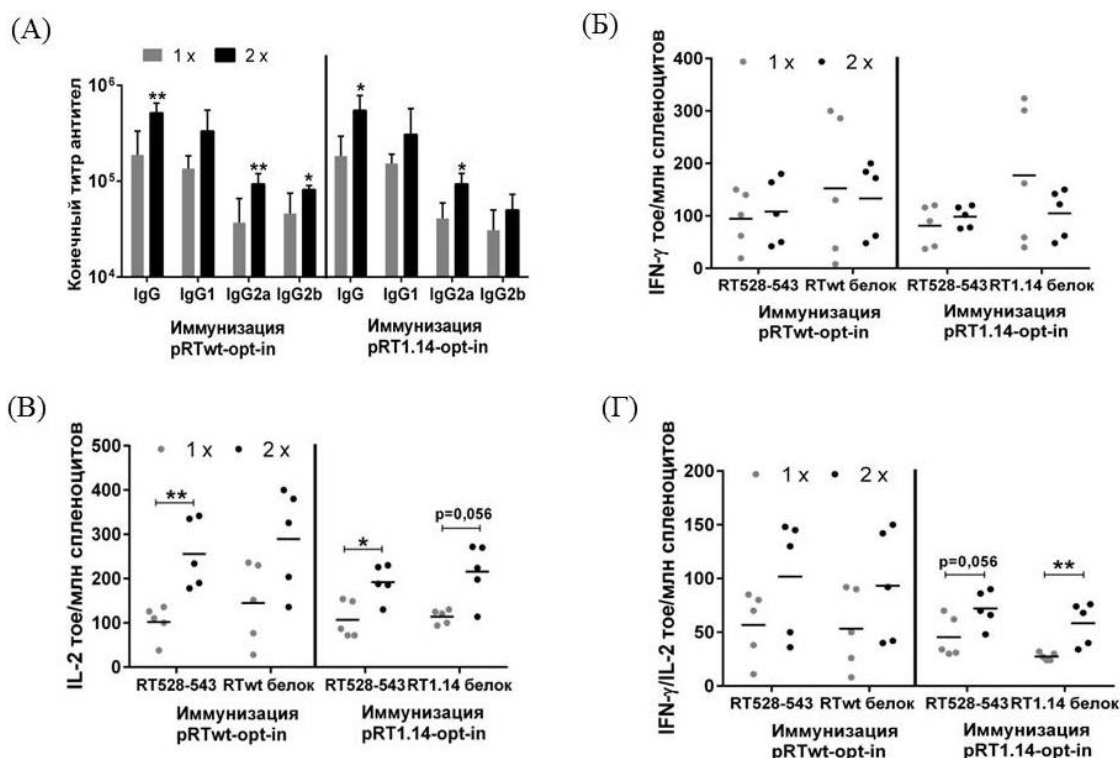


Рисунок 11. Реактивность анти-RT антител и продукция IFN- $\gamma$ /IL-2 спленоцитами после однократной (1x) и двукратной (2x) иммунизаций мышей. (А) Титры антител на тот же вариант белка RT, что использован в иммунизации, mean+SD. (Б-Г) Флуороспот, стимуляция спленоцитов RT528-543 и RTwt, RT1.14 белками; количество клеток, секретирующих IFN- $\gamma$  (Б), IL-2 (В) и IFN- $\gamma$ /IL-2 (Г) (тое) на млн спленоцитов, mean двух повторностей на мыш. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ ; тенденции к различию указаны на диаграмме.

Для более детальной оценки клеточного ответа после двукратной иммунизации RT спленоциты пулировали в группах иммунизированных мышей, стимулировали пептидами, представляющими а.о. 465-476, 514-528 и 528-543 (RT528-543, RT465-476, RT514-528), два из которых включали известные CD8 $^{+}$  эпитопы, и белками RTwt и RT1.14. Специфическую продукцию соответствующих цитокинов CD4 $^{+}$  и CD8 $^{+}$  Т-клетками проанализировали проточной цитофлуориметрией. Для этого стимулированные клетки окрашивали антителами к CD3, CD4, CD8 рецепторам и цитокинам IFN- $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$  и вычисляли пороговое значение специфического ответа на ДНК-иммунизацию как среднее значение процента CD4 $^{+}$  и CD8 $^{+}$  Т-клеток, продуцирующих цитокины, в контрольном образце (иммунизация вектором) + 3SD. Ответ на ДНК-иммунизацию считали специфическим, если процент Т-лимфоцитов, продуцирующих цитокины, у RT-иммунизированных мышей превышал это значение. В таблице 1 представлено число

пептидов/белков, распознаваемых CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетками с продукцией IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ . Иммунизация как pRTwt-opt-in, так и pRT1.14-opt-in индуцировала ответ CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, который выражался в преимущественной продукции IL-2 и TNF- $\alpha$ . IFN- $\gamma$  продуцировался только активированными CD8<sup>+</sup> Т-клетками, однако частота такого ответа на пептиды из состава RT была ниже, чем при продукции IL-2 и TNF- $\alpha$  (таблица 1). Активация Т-клеток с подобным профилем цитокинов может играть важную роль в ВИЧ-инфекции: продукция IL-2 может способствовать пролиферации эффекторных ВИЧ-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток, а TNF- $\alpha$ -секретирующие клетки могут иметь цитотоксические функции. Стоит отметить, что среди CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, продуцирующих данные цитокины, около 1% Т-клеток были полифункциональными, то есть продуцировали одновременно два или три цитокина. Наличие полифункциональных Т-клеток с подобным профилем продукции цитокинов характерно для контролёров виремии ВИЧ, а значит, может способствовать иммунному контролю репликации вируса.

Таблица 1. Частота распознавания RT-антигенов, оцененная по продукции цитокинов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами после двукратной иммунизации pRTwt-opt-in и pRT1.14-opt-in. Показано число RT-пептидов/белков (из суммарного числа 5), распознаваемых Т-лимфоцитами со специфической продукцией цитокинов.

	CD4 <sup>+</sup>			CD8 <sup>+</sup>		
	IFN- $\gamma$	IL-2	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	IL-2	TNF- $\alpha$
pRTwt-opt-in	0	4	5	2	5	5
pRT1.14-opt-in	1	4	5	3	5	5

Двукратная иммунизация могла повысить и эффекторный потенциал RT-специфического ответа, выраженный в способности уничтожать клетки, продуцирующие антиген. Для проверки этого предположения мышей иммунизировали двукратно в стандартных условиях: RTwt-opt-in и pRT1.14-opt-in, через 4 недели – смесями pRTwt-opt-in/pLuc и pRT1.14-opt-in/pLuc, соответственно. Биолюминесценцию регистрировали после второй инъекции. Уровень биолюминесценции резко снизился на 9 день после второй инъекции, то есть на неделю раньше, чем при однократной иммунизации (рисунки 10, 12). По всей видимости, RT-специфический ответ сформировался уже после первой инъекции и был усилен за счёт второй, то есть двукратная иммунизация повысила его эффекторный потенциал. На основании этих данных была предложена экспериментальная модель проверки эффекторного иммунного ответа *in vivo* методом «антигенной угрозы»: иммунизация плазмидой, кодирующей антиген, и затем её смесью с плазмидой, кодирующей репортер, с дальнейшим мониторингом динамики биолюминесценции

(скорости уничтожения клеток) в сайтах инъекции. Эта модель позволит оценить эффективность иммунного ответа в доклинических испытаниях, если заражение патогеном напрямую невозможно.

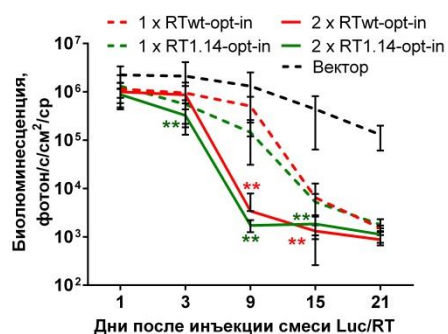


Рисунок 12. Динамика биolumинесценции при двукратной иммунизации. Средняя величина потока фотонов в сайте инъекции (2 сайта на мышь), mean±SD. \*\*p<0,01 – различия между иммунизациями RT-кодирующими плазмидами и вектором; цвет \*\* совпадает с цветом кривой.

## 8.2. Доставка ДНК

Двукратная иммунизация RT-кодирующими плазмидами значительно повысила продукцию антител к RT и несколько повысила RT-специфический клеточный ответ. Условия доставки ДНК-вакцин также могут значительно влиять на иммунный ответ, поэтому в данной работе этим условиям уделили особое внимание. Применённые в иммунизациях стандартные условия доставки RT-кодирующих плазмид (инъекции инсулиновым шприцем, электропорация на приборе Dermavax с многоигольчатыми (МИ) электродами) обеспечивали эффективную трансфекцию и иммунный ответ. Однако существуют и более современные технологии введения ДНК, в частности, микроиглами и Биожектором – безыгольчатым неинвазивным устройством, показавшим эффективность в клинических испытаниях. Их эффективность оценили на примере доставки антигенов RT и Luc, кодируемых плазмидами, в сравнении с введением стандартным методом – инсулиновым шприцем. Во всех случаях введение сопровождалось электропорацией участка иммунизации. Микроиглы и инсулиновый шприц показали сходную эффективность, менее эффективным средством доставки ДНК оказался Биожектор.

Также провели оптимизацию режима электропорации (ЭП). Эффективность ЭП определяется параметрами электрических импульсов и конфигурацией электродов. На примере МИ электродов выявили наиболее эффективную комбинацию параметров импульсов: напряжение 100 В, «короткие» импульсы (10 мс с интервалами 20 мс) переменной полярности. Сравнение МИ электродов с двумя другими типами инвазивных

электродов типов «вилка-пластина» и «две иглы» и неинвазивными плоскими электродами подтвердило эффективность МИ электродов и выявило сходную с ней эффективность электродов «вилка-пластина». Электроды других типов уступали в эффективности, поэтому в дальнейшем не использовались.

## **9. Влияние мутаций лекарственной устойчивости на иммуногенность RT**

У пациентов с ВИЧ-1, получающих АРТ, с высокой частотой образуются варианты ВИЧ-1 с мутациями лекарственной устойчивости (ЛУ), в том числе в составе RT. Мутации ЛУ могут приводить к потере распознавания эпитопов, содержащих мутации, и снижению иммунного ответа. Однако в некоторых случаях формируется эффективный специфический иммунный ответ на участки, содержащие мутации. Поэтому в данной работе оценили различия в распознавании эпитопов RT из областей с мутациями ЛУ в двукратной иммунизации pRTwt-opt-in и pRT1.14-opt-in. Сначала в тесте Флуороспот выявили пептиды из этих областей RT, которые распознавались спленоцитами иммунизированных мышей. Они преимущественно относились к области RT а.о. 199-223, включающей несколько мутаций ЛУ и наряду с этим известные иммунодоминантные эпитопы RT. Детальное исследование распознавания CD4+ и CD8+ Т-клетками пептидов из этой области провели с помощью проточной цитофлуориметрии (таблица 2), как это было описано в разделе 8.1. При иммунизации RT-кодирующими плазмидами частота распознавания пептидов была выше у CD8+ Т-клеток, чем у CD4+ Т-клеток, что закономерно, поскольку область RT а.о. 199-223 характеризуется наличием нескольких CD8+ эпитопов. При этом частота распознавания CD8+ Т-эпитопов при ДНК-иммунизации ЛУ вариантом RT была в 2 раза ниже, чем при ДНК-иммунизации RT дикого типа, тогда как распознавание CD4+ Т-клетками не различалось между этими иммунизациями (таблица 2). Наличие мутаций как внутри последовательности эпитопа, так и за его пределами может негативно сказаться на процессинге антигена, особенно протеасомой/иммунопротеасомой (Boberg и др., 2008), что может привести к исчезновению эпитопов в областях мутаций. Возможно, именно этот эффект наблюдался при распознавании области а.о. 199-223 RT спленоцитами мышей, иммунизированных pRT1.14-opt-in. Таким образом, наличие мутаций ЛУ в антигене RT не повлияло на силу клеточного иммунного ответа на полноразмерные RT белки (рисунки 9, 11), но изменило его природу и специфичность к отдельным эпитопам (таблица 2). При ВИЧ-инфекции исчезновение эпитопов в участках, несущих ЛУ мутации, может способствовать распространению соответствующих мутантных вариантов ВИЧ, уходящих от действия как АРТ, так и иммунной системы. В силу вероятности таких событий в вакцинации

предпочтительнее использовать антигены не с вирусными, а с синтетическими консенсусными аминокислотными последовательностями и вставками единичных или множественных первичных мутаций ЛУ, известных из данных молекулярной эпидемиологии. Иммунизация этими вариантами антигенов могла бы блокировать накопление первичных мутаций ЛУ и исключить возможность его адаптации к иммунной системе хозяина.

Таблица 2. Распознавание CD4+ и CD8+ Т-клеточных эпитопов в регионе RT а.о. 199-223 без мутаций ЛУ и с ними. Распознаваемые регионы RT обозначены «+», серым цветом указаны случаи, когда распознавание различалось между иммунизациями RTwt и RT1.14. wt, dr (drug resistant – ЛУ) – пептид с последовательностью из RTwt или RT1.14 вариантов, соответственно.

Пептиды для стимуляции спленоцитов	Продукция цитокинов					
	pRTwt-opt-in иммунизация			pRT1.14-opt-in иммунизация		
	IFN- $\gamma$	IL-2	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	IL-2	TNF- $\alpha$
	Распознавание CD4+ Т-клетками					
RT199-216dr	+	-	-	+	-	-
RT202-210wt	-	+	+	-	-	+
RT202-210dr	-	-	-	-	-	-
RT205-220wt	-	-	-	-	+	+
RT205-220dr	-	-	+	-	-	-
RT207-215wt	-	-	+	-	-	+
RT207-215dr	-	-	-	-	-	+
RT207-223wt	-	+	+	-	+	-
RT207-223dr	-	+	-	-	-	-
	Распознавание CD8+ Т-клетками					
RT199-216dr	+	+	-	-	-	-
RT202-210wt	-	+	+	-	-	-
RT202-210dr	-	-	-	-	-	-
RT205-220wt	+	+	-	+	-	-
RT205-220dr	+	+	+	-	-	-
RT207-215wt	+	+	+	+	+	+
RT207-215dr	-	-	+	-	-	+
RT207-223wt	-	+	-	-	+	-
RT207-223dr	+	+	-	+	+	+

### Заключение

Данная работа посвящена созданию прототипа ДНК-вакцины на основе обратной транскриптазы (РТ) ВИЧ-1 и повышению его иммуногенности, в особенности к лекарственно устойчивым (ЛУ) формам ВИЧ. С учётом требований к уровню синтеза и безопасности компонентов вакцин в работе были созданы варианты антигенов РТ. Они

кодировались плазмидами, обеспечивающими высокий уровень синтеза RT в эукариотических клетках. Синтез вариантов RT в клетках приводил к индукции окислительного стресса, который мог влиять на иммунный ответ при ДНК-вакцинации.

Иммуногенность полученных антигенов RT оценили в экспериментах по ДНК-иммунизации мышей. Повышение уровня синтеза RT за счёт оптимизации последовательности гена оказало значительное влияние на иммуногенность: возрос антительный ответ и продукция цитокинов IFN- $\gamma$  и IL-2. Индуцируемый оптимизированными вариантами RT-специфический иммунный ответ показал свою эффективность *in vivo* в уничтожении RT-синтезирующих клеток в сайтах ДНК-иммунизации. Это особенно важное свойство для терапевтической вакцины, которая нацелена на уничтожение клеток, инфицированных ВИЧ и продуцирующих вирусные антигены.

Интересно, что ДНК-иммунизация прототипами полученных вакцин вызывала мощный антительный иммунный ответ. При этом, исходя из внутриклеточной локализации RT и её процессинга протеасомой, иммунизация RT должна была преимущественно индуцировать CD8<sup>+</sup> Т-клеточный, а не антительный ответ. Подобный профиль RT-специфического иммунного ответа, показанный в данной работе, может быть связан со способностью RT индуцировать окислительный стресс, а также с присутствием небольшого количества RT вне клеток, что обуславливает возможность её процессинга и презентации в составе МНС класса II.

Для снижения уровня окислительного стресса RT была выведена из клетки путём введения в её состав сигнала секреции. Секретируемая форма RT была более стабильна в клетке, чем исходный фермент, а индуцируемый ею уровень окислительного стресса несколько снизился, но всё же оставался значительным. Снижение индукции окислительного стресса секретируемой формой RT не оказало влияния на её иммуногенность.

В работе применили комплекс подходов, направленных на повышение иммуногенности ДНК-вакцин. Двукратная иммунизация с интервалом в 4 недели значительно повысила антительный ответ к RT. Двукратная иммунизация также повысила клеточный ответ на RT; среди популяций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в основном активировались клетки, продуцирующие IL-2 и TNF- $\alpha$ , а часть из них была полифункциональной. Подобная функциональность Т-клеток может играть роль в остановке прогрессии ВИЧ-инфекции.

Повторная иммунизация повысила и эффекторный потенциал иммунного ответа, вызвав масштабное уничтожение антиген-продуцирующих клеток на неделю раньше, чем

при однократной иммунизации. На основании этих результатов была предложена модель антигенной угрозы, которая может быть использована в доклинических испытаниях вакцин, когда прямое заражение тестируемых животных патогеном невозможно. В работе также подтвердили, что для достижения высокой иммуногенности ДНК-вакцин важна оптимизация доставки ДНК, в частности, способа её введения и последующей электропорации участка иммунизации.

В работе было показано, что ДНК-иммунизация природными лекарственно устойчивыми формами RT может приводить к нарушению распознавания участков RT, содержащих мутации ЛУ, и к снижению иммунного ответа по сравнению с ответом на белок без мутаций. Этот результат свидетельствует в пользу применения консенсусных последовательностей вирусных антигенов в терапевтической вакцинации.

Полученные данные имеют теоретическую и практическую ценность. Они расширяют сведения о свойствах обратной транскриптазы – важного белка ВИЧ и компонента терапии против него, а также могут найти применение в испытаниях кандидатных терапевтических вакцин, нацеленных на лекарственно устойчивый ВИЧ на приматах и людях.

### **Выводы**

1. Разработаны прототипы ДНК-вакцины на основе вариантов RT ВИЧ-1 субтипа В: дикого типа и с мутациями лекарственной устойчивости, ферментативно активных или инактивированных, кодируемых вирусными или оптимизированными по экспрессии синтетическими генами.

2. Оптимизация кодирующей последовательности повышает уровень синтеза RT в 5 раз. Кодируемая таким синтетическим геном RT имеет внутриклеточную локализацию, процессируется протеасомой и индуцирует в клетке окислительный стресс, так же как и RT, кодируемая вирусной последовательностью.

3. Оптимизация нуклеотидной последовательности гена, кодирующего RT в составе ДНК-вакцины, значительно повышает RT-специфический клеточный и антительный иммунный ответ. Мутации, ингибирующие ферментативную активность RT, не влияют на иммунный ответ. Мутации лекарственной устойчивости в RT приводят к изменению распознавания эпитопов в участках, несущих эти мутации.

4. Добавление сигнала секреции гетерологичного белка к RT обеспечивает её выведение из клетки, повышает её устойчивость к действию клеточных протеаз и снижает индукцию RT-специфического окислительного стресса, но не вызывает изменения силы и специфичности RT-специфического иммунного ответа.



5. Для индукции RT-специфического ответа в иммунизации мышей наиболее эффективными подходами являются двукратная иммунизация с интервалом 4 недели, введение ДНК с помощью инсулинового шприца или микроигл в сочетании с последующей электропорацией.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи

1. Isaguliants M., Smirnova O., Ivanov A.V., Kilpelainen A., Kuzmenko Y., Petkov S., **Latanova A.**, Krotova O., Engström G., Karpov V., Kochetkov S., Wahren B., Starodubova E. Oxidative stress induced by HIV-1 reverse transcriptase modulates the enzyme's performance in gene immunization // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2013. – V. 9. – № 10. – P. 2111-2119.
2. **Latanova A.**, Petkov S., Kuzmenko Y., Kilpeläinen A, Ivanov A, Smirnova O, Krotova O, Korolev S, Hinkula J, Karpov V, Isaguliants M, Starodubova E. Fusion to Flaviviral Leader Peptide Targets HIV-1 Reverse Transcriptase for Secretion and Reduces its Enzymatic Activity and Ability to Induce Oxidative Stress but Has No Major Effects on Its Immunogenic Performance in DNA-immunized Mice // *Journal of Immunology Research*. – 2017. – V. 2017. – P. 7407136.
3. **Latanova A.A.**, Petkov S., Kilpelainen A., Jansons J., Latyshev O.E., Kuzmenko Y.V., Hinkula J., Abakumov M.A., Valuev-Elliston V.T., Gomelsky M., Karpov V.L., Chiodi F., Wahren B., Logunov D.Y., Starodubova E.S., Isaguliants M.G. Codon optimization and improved delivery/immunization regimen enhance the immune response against wild-type and drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase, preserving its Th2-polarity // *Scientific Reports*. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 8078.
4. Petkov S., Starodubova E., **Latanova A.**, Kilpeläinen A., Latyshev O., Svirskis S., Wahren B., Chiodi F., Gordeychuk I., Isaguliants M. DNA immunization site determines the level of gene expression and the magnitude, but not the type of the induced immune response // *PLoS One*. – 2018. – V. 13. – № 6. – P. e0197902.

## Тезисы докладов на конференциях

1. **Latanova A.**, Starodubova E., Petkov S., Kuzmenko Y., Krotova O., Isaguliants M., Karpov V. Retargeting of HIV reverse transcriptase to MHC class II processing improves its immunogenicity // Proceedings of 4-th International Conference on Vaccines & Vaccination, Valencia, Spain, September 24–26, 2014. – 2014. – V.5. – №5. – P. 160.
2. **Латанова А.А.**, Кузьменко Ю.В., Стародубова Е.С., Карпов В.Л. Получение секретируемой формы обратной транскриптазы ВИЧ-1 // Сборник тезисов 18 Международной Пушинской Школы-Конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино, 21–25 апреля, 2014. – 2014. – С. 262-263.
3. **Latanova A.**, Starodubova E., Tikhvatulin A., Kilpeläinen A., Petkov S., Latyshev O., Kuzmenko Y., Eliseeva O., Karpov V., Logunov D., Isaguliants M. Comparison of the performance of plate, plate/fork, two- and multi-needle electrodes in gene electroporation of mice // Modern vaccine adjuvants & delivery systems, Leiden, the Netherlands, May 18–20, 2015.
4. **Latanova Anastasia**, Petkov Stefan, Kuzmenko Yulia, Kilpeläinen Athina, Ivanov Alexander, Smirnova Olga, Latyshev Oleg, Hinkula Jorma, Karpov Vadim, Isaguliants Maria, Starodubova Elizaveta. Both secreted and intracellular forms of HIV-1 reverse transcriptase induce oxidative stress and exhibit similar immunogenicity in DNA-immunized mice // Abstract book (oral) of 10-th Vaccine Congress, Amsterdam, the Netherlands, September 4–7, 2016. – 2016. – P. 51.
5. **Latanova Anastasia**, Petkov Stefan, Kilpeläinen Athina, Latyshev Oleg, Yasuhiro Moriizumi, Gomelsky Mark, Isaguliants Maria, Starodubova Elizaveta. Overcoming low immunogenicity of reverse transcriptase in therapeutic HIV vaccine design // Abstract book (posters) of 10-th Vaccine Congress, Amsterdam, the Netherlands, September 4–7, 2016. – 2016. – P. 28.
6. **Latanova A.A.**, Petkov S., Latyshev O.E., Kilpelainen A., Jansons J., Kuzmenko Y.V., Moriizumi Y., Karpov V.L., Gomelsky M., Isaguliants M.G., Starodubova E.S. Design and delivery of plasmids encoding wild-type and drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase insure their efficient performance in mice // Abstract book of International conference «Vaccines & Vaccination», Moscow, September 27 – October 1, 2017. – 2017. – P.41.
7. **Latanova A.A.**, Petkov S., Jansons J., Kilpelainen A., Eliseeva O., Latyshev O.E., Starodubova E.S., Gordeychuk I.V., Isaguliants M.G. Electroporation, a magic wand in DNA vaccination // Abstract book of International conference «Perspective technologies in vaccination and immunotherapy», Moscow, October 5–8, 2018. – 2018. – P.32.