

**РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ЗАРОДЫШЕВОЙ ФОРМЫ
ВИЧ-СПЕЦИФИЧНОГО ШИРОКО НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИТЕЛА 10E8**

Д.С. Черникова

Научный руководитель: канд. биол. наук, А.А. Горчаков

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН,

Россия, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8/2, 630090

Новосибирский национальный исследовательский государственный Университет

Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, 630090

E-mail: chern_ds@mcb.nsc.ru

**DESIGN OF A SENSOR CELL LINE BASED ON THE GERMLINE VERSION OF THE HIV-
SPECIFIC BROADLY NEUTRALIZING ANTIBODY 10E8**

D.S. Chernikova

Scientific Supervisor: Ph.D. A.A. Gorchakov

Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS,

Russia, Novosibirsk, Acad. Lavrentiev Ave. 8/2, 630090

Novosibirsk National Research State University, Russia, Novosibirsk, Pirogova Str. 2, 630090

E-mail: chern_ds@mcb.nsc.ru

Abstract. Identification of antigens driving affinity maturation of broadly neutralizing antibodies is one of the most challenging endeavors in the HIV vaccine development field. In order to isolate such candidate immunogens and to analyze whether they may activate B-cells expressing BCRs based on immature/germline forms of broadly neutralizing antibodies, a robust test system that faithfully recapitulates human B-cell biology would be indispensable. Thus, developing a human B-cell sensor line with surface expression of a germline variant of broadly neutralizing antibody 10E8 may represent one of the possible solutions.

Актуальность. Создание эффективной вакцины против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1, далее ВИЧ) уже свыше тридцати лет является одной из самых актуальных, но, однако, до сих пор нерешенных задач инфекционной иммунологии. Все дело в том, что ВИЧ обладает уникальным набором свойств, защищающих его от воздействия клеток иммунной системы хозяина. Основным препятствием при разработке вакцины является огромное генетическое разнообразие вариантов ВИЧ. Так, большинство антител, появляющихся при ВИЧ-инфекции или иммунизации традиционными ВИЧ-антигенами, направлены против доминантных изменчивых эпитопов ВИЧ и являются специфичными к определенному вирусному изоляту. Вследствие этого, нейтрализующие свойства таких антител легко преодолеваются. Очевидно, что для эффективной защиты против ВИЧ-инфекции вакцина должна индуцировать образование антител, способных нейтрализовать максимальное разнообразие генетических вариантов вируса. Такие антитела, демонстрирующие высокую нейтрализующую способность, направлены против структурно-консервативных областей (так называемых областей уязвимости, необходимых вирусу для проникновения в клетку-мишень), и называются широко нейтрализующими антителами (broadly neutralizing antibodies, далее bnAb) [1]. Изучение гуморального иммунитета

зараженных ВИЧ людей показало, что появление данных антител наблюдается только у части ВИЧ-инфицированных и по прошествии длительного времени после проникновения вируса в организм (спустя 1-3 года), что связано с длительным путем созревания уникальных комбинаций зародышевых V-генов, соответствующих bnAb. Примечательно, что антигены ВИЧ не взаимодействуют с продуктами таких зародышевых форм bnAb и, как следствие, не способны стимулировать активацию и созревание соответствующих им крайне редких В-клеток [2]. Таким образом, в настоящее время механизм возникновения в организме bnAb не известен.

Данные наблюдения легли в основу новой стратегии создания вакцины против ВИЧ. Ее цель – получить путем иммунизации пул В-клеток, способных производить bnAb. В рамках данной стратегии вакцинации необходимо разработать серию иммуногенов, способных стимулировать пролиферацию В-клеток, экспрессирующих зародышевые формы bnAb, и обеспечить направленное созревание зародышевых предшественников в зрелые формы bnAb [3]. Как же узнать, стимулирует ли выбранный иммуноген размножение редких В-клеток, несущих зародышевые формы bnAb, и их «дозревание» исключительно в выбранном направлении, ведущем к образованию полноценных, зрелых bnAb?

Ввиду значительных отличий последовательностей V-генов, необходимых для развития bnAb, у человека и мыши, иммунизация лабораторных животных мало информативна для изучения развития иммунного ответа. С другой стороны, использование приматов крайне дорого. В связи с этим, мы считаем, что для оценки эффективности активации В-клеток выбранным иммуногеном необходимо создание тест-системы, максимально точно имитирующей биологию В-клеток человека. Такой клеточной моделью может служить В-клеточная линия-сенсор с поверхностной экспрессией зародышевой версии ВИЧ-специфичного широко нейтрализующего антитела в виде В-клеточных рецепторов.

Цель исследования. Целью данной работы являлось создание функциональной стабильной сенсорной линии с поверхностной экспрессией g11E8, - зародышевой версии ВИЧ-специфичного широко нейтрализующего антитела 10E8. Выбор антитела 10E8 обусловлен тем, что оно обладает очень высоким нейтрализующим потенциалом: оно нейтрализует 97-99% разновидностей ВИЧ, что является одним из лучших показателей среди всех bnAb.

Для достижения данной цели в рамках работы были поставлены следующие задачи: во-первых, получить лентивирусную конструкцию для создания стабильной В-клеточной сенсорной линии, конститутивно экспрессирующей g110E8 в формате мембран-ассоциированного IgG1; во-вторых, перенести лентивирусные конструкции в клетки В-клеточной лимфомы человека DG-75 для создания стабильной В-клеточной сенсорной линии с поверхностной экспрессией g110E8 – DG-75(g110E8); в-третьих, провести функциональное тестирование полученной сенсорной линии с поверхностной экспрессией g110E8.

Экспериментальная часть. Первой задачей данной работы было получение путем многоэтапного молекулярного клонирования лентивирусной ДНК-конструкции, кодирующей сенсор на основе g110E8. В качестве основы В-клеточного рецептора в нашей работе использованы константные части IgG1 (тяжелая цепь $\gamma 1$), а комбинациями VH- и VL-областей образованы антигенраспознающие области антитела g110E8. В качестве основы целевой конструкции был использован лентивирусный вектор pCDH. Для получения вирусных частиц была проведена ко-трансфекция клеточной линии HEK293T

полученной лентивирусной конструкцией с паковочными плазидами. Данные вирусные частицы затем использовались для трансдукции целевой клеточной линии В-клеточной лимфомы человека DG-75. Воспользовавшись тем, что в структуре лентивирусной конструкции присутствует ген устойчивости к зеоцину, была проведена селекция трансдуктантов на среде с этим антибиотиком.

Для оценки способности полученной сенсорной линии активироваться в ответ на кросс-сшивку В-клеточного рецептора был проведен Ca-flux анализ. Добавление к клеткам антител против иммуноглобулина G приводит к кросс-сшивке В-клеточных рецепторов и активации клетки за счет мобилизации ионов кальция из внутриклеточного депо, что регистрируется с помощью специального кальций-чувствительного флуоресцентного зонда. По результатам проведенного эксперимента сенсорная линия была успешно активирована.

Результаты. В результате проделанной работы была получена стабильная функциональная В-клеточная линия с поверхностной экспрессией зародышевой формы ВИЧ-специфичного широко нейтрализующего антитела 10E8. Полученная сенсорная линия используется нами для тестирования невирусных иммуногенов, взаимодействующих с зародышевой формой широко нейтрализующего антитела 10E8. При инкубации кандидатного иммуногена с сенсорной линией о наличии или отсутствии взаимодействия можно судить, используя FACS-анализ. Одновременно способность иммуногенов активировать В-клетки, несущие на поверхности зародышевую форму bnAb, можно оценить, используя метод Ca-flux.

Заключение. Использование сенсорной линии DG-75(g110E8) обладает следующими преимуществами перед «классическими» системами: эта *in vitro* система максимально близко воспроизводит основные молекулярные события, происходящие при антиген-индуцированной активации и созревании В-клеток человека, она экономична, высокопроизводительна и, что немаловажно, позволяет проводить отбор иммуногенов любой природы. Создание сенсорной линии с поверхностной экспрессией зародышевой формы ВИЧ-специфичного bnAb 10E8 является первым важным шагом в создании целой линейки сенсорных линий, необходимых для разработки полного набора кандидатных иммуногенов, способных стимулировать не только g110E8, но также аффинное созревание широко нейтрализующих антител в зрелую форму 10E8, которая позволит эффективно уничтожать ВИЧ и тем самым предотвращать заражение.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект № 16-04-00915).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mouquet H. (2014). Antibody B cell responses in HIV-1 infection. Trends Immunol, v. 35, no. 11, pp. 549-561.
2. Xiao X., Chen W., Feng Y., Zhu Z. (2009). Germline-like predecessors of broadly neutralizing antibodies lack measurable binding to HIV-1 envelope glycoproteins: implications for evasion of immune responses and design of vaccine immunogens. Biochem Biophys Res Commun, v. 390, no. 3, pp. 404-409.
3. Haynes B. F., Kelsoe G., Harrison S. C., Kepler T. B. (2012) B-cell-lineage immunogen design in vaccine development with HIV-1 as a case study. Nat Biotechnol, v. 30, no. 5, pp. 423-433.