

**ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ,
ПОВТОРЯЮЩИХ V3 ПЕТЛЮ ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА GP 120 ВИЧ
1, ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИИ
ИММУНОАДЬЮВАНТА POLY (I:C)**

Коробова С. В. ¹,

Топорова В. А. ²,

Алхазова Б. И. ¹,

Головина М. Э. ¹,

Апарин П. Г. ¹

¹ ФГБУ “ГНЦ “Институт иммунологии” ФМБА России.

² ФГБУ науки Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

**IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF SYNTHETIC PEPTIDES THAT
COPY V3 LOOP REGION OF THE HIV-1 GP120 ENVELOPE PROTEIN
WITH VARIOUS METHOD OF ADMINISTRATION AND POLY (I:C)
IMMUNOADJUVANT USE**

Korobova S. V. ^a,

Toporova V. A. ^b,

Alkhazova B. I. ^a,

Golovina M. E. ^a,

Aparin P. G. ^a

^a NRC Institute of Immunology FMBA of Russia.

^b M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov - Institute of bioorganic chemistry of the Russian Academy of Sciences.

Резюме

Синтетические пептиды являются хорошей основой для создания вакцины против ВИЧ/СПИД. Иммунизация ими фокусирует иммунный ответ только на определенный эпитоп, они способны активировать обе ветви иммунного ответа, и безопасны при введении в организм человека. Имея низкий молекулярный вес синтетические пептиды обладают низкой иммуногенностью, поэтому необходимо использовать различные иммуноадаьюванты в составе иммуногенной композиции. V3-петля оболочечного белка gp120 ВИЧ1 является одним из основных протективных эпитопов, на него получено ряд моноклональных антител с широкой нейтрализующей активностью. Нами было проведено исследование иммуногенности пептидов, копирующих V3 петлю консенсусной последовательности вирусов группы М ВИЧ1 и российского изолята RUA022a2, в зависимости от способа введения (подкожно и внутрибрюшинно) и использования иммуноадаьюванта. В качестве адаьюванта применялся синтетический аналог двуцепочечной РНК - poly (I:C), являющийся лигандом рецепторов врожденного иммунитета TLR3. Исследования проводилось на мышах линии balb/c. Показано, что способ введения не влияет на формирование иммунного ответа на пептиды. Однако в группах, где использовался иммуноадаьювант наблюдалось более ранняя продукция специфических IgG антител. При этом титр антител, после третьего, последнего, введения были незначительно выше в группах, где пептиды вводились с адаьювантом. Также не было выявлено отличий в изотипе индуцированных антител. Во всех группах преимущественно образовывались IgG1 антитела. Специфические антитела класса IgM выявлялись только после третьего введения антигена. На их титр не влиял способ введения, а уровень антител был также незначительно выше в группе с poly (I:C). Полученные антитела не обладали нейтрализующей активностью по отношению изолята QF495.23.M.EnvA1. При исследовании антиген-специфической клеточной активации, показано, что только в группах, где применялся poly(I:C) выявляется продукция IFN γ – маркера Th1 ответа. Кроме того, группах, где в составе иммуногенной композиции присутствовал poly (I:C), определялся низкий уровень противовоспалительного цитокина IL10, больше всего его выявлялось в группах с внутрибрюшинным введением. Проведенные исследования показали, что использование адаьюванта poly (I:C) способствует формированию иммунного ответа на синтетические пептиды, вызывая более раннюю индукцию специфических антител, а также переключению на Th1 путь. Полученные данные могут применяться при дизайне вакцин против ВИЧ/СПИД и других вирусных инфекций, для повышения их иммуногенности и возможности индукции протективного иммунного ответа.

Ключевые слова: ВИЧ, пептиды, вакцина, нейтрализующие антитела, иммуноадаьюванты, poly (I:C), мыши.

Abstract

Synthetic peptides are a good basis for HIV vaccine development. The immune response are focused only on a specific epitope after their administration, they are able to activate both pathways (humoral and cellular) of the immune response, and they are safe and well tolerated. Having a low molecular weight, synthetic peptides possess a low immunogenicity, therefore it is necessary to use various immunoadjuvants in an immunogenic composition. We conducted a study of the immunogenicity of peptides that copy the V3 loop of the group M HIV1 virus consensus sequence and the Russian isolate RUA022a2. The impact of the method of administration (subcutaneously and intraperitoneally) and the use of an immunoadjuvant was also assessed. A synthetic analogue of double-stranded RNA, poly (I:C), was used as an adjuvant. The studies were conducted on balb/c mice. Earlier production of specific IgG antibodies was observed in the groups where the immunoadjuvant was used. The antibody titer was slightly higher in the groups where peptides were administered with the adjuvant after the third (last) administration. There were also no differences in the isotype of the induced antibodies. IgG1 antibodies were predominantly induced in all groups. Specific IgM antibodies were detected only after the third administration of the antigens. Their titer did not depend on the administration method and the antibody titer was slightly higher in the groups where peptides were administered with the poly (I:C). The induced antibodies did not have neutralizing activity against isolate QF495.23.M.EnvA1. In the study of antigen-specific cellular activation the IFN γ production is detected only in groups where poly(I:C) was used. In addition, a low level of anti-inflammatory cytokine IL10 was determined in groups where poly (I:C) was included in the immunogenic composition. IL10 highest level was detected in groups with intraperitoneal administration. Studies have shown that the use of poly (I:C) adjuvant promotes the immune response development to the synthetic peptides, that contributes to earlier induction of specific antibodies, as well as switching to the Th1 pathway.

Keywords: HIV, peptides, vaccine, neutralizing antibodies, immunoadjuvants, poly (I:C), mice.

1 Введение

Получение вакцины против ВИЧ/СПИД остается приоритетной задачей здравоохранения. Хотя в последние годы достигнуты значительные успехи в терапии заболевания, позволяющее продлить и улучшить качество жизни инфицированного, полностью удалить ВИЧ из организма нельзя. Кроме того, возникают штаммы вируса устойчивые к лекарственным препаратам.

Вакцина против ВИЧ/СПИД должна индуцировать обе ветви иммунного ответа: клеточную и гуморальную. Антитела играют важную роль в защите против инфекции, включая ВИЧ. Связываясь с вирусом, они препятствуют его проникновению в клетку. Проведенное недавно исследование по опосредованной профилактике моноклональными антителами показало, что пассивное введение широко нейтрализующих антител с достаточной специфичностью может защитить от ВИЧ-инфекции за счет нейтрализации чувствительных штаммов, если уровень сывороточных антител достаточно высок [3]. Проникновение вируса в клетку – сложный многоступенчатый процесс, ключевую роль в котором играет связывание оболочечного белка вируса gp120, а именно его V3-петли, с корцепторами CCR5 или CXCR4. Мутации, приводящие к удалению этого участка, делают вирус неинфекционным [5]. Хотя этот участок относится к вариабильной части белка, около 60% аминокислот являются консервативными [13]. Антитела к V3-петле обнаруживаются почти у всех ВИЧ-инфицированных. К этому участку получен ряд моноклональных антител (447-52D, 2219, F425-B4e8, 2557, и 3074), обладающих широкой нейтрализующей активностью [6]. Роль цитотоксических лимфоцитов была показана при исследовании ВИЧ-инфицированных, не получающих вирус-специфическую терапию. Пациенты, у которых была низкая вирусная нагрузка, имели высокий уровень специфических CD8⁺ клеток. Связь специфического ответа CD8⁺ Т-клеток с низкой вирусемией не зависела от типа HLA и не была связана с сохранением последовательности эпитопа [7]. Кроме того, цитотоксические лимфоциты разрушают уже зараженные вирусом клетки.

При дизайне вакцин, выборе последовательности для вакцинных антигенов, необходимо учитывать, что для каждого географического региона, характерен определенный субтип ВИЧ. В Российской Федерации преобладает субтип А, но также выявляется субтип В и рекомбинантные формы [12]. Для расширения специфичности иммунного ответа разработана консенсусная последовательность группы М, куда входят большинство субтипов ВИЧ. В ее основе лежит включение наиболее распространенных аминокислот в каждой позиции из всех доступных вирусных последовательностей [8].

Синтетические пептиды являются хорошей основой для создания вакцины против ВИЧ. Они копируют строго определенные эпитопы. Это позволяет вызывать иммунный ответ нужной специфичности. Кроме того, пептиды способны индуцировать как антитела, так и ЦТЛ.

Ранее нами были получены и исследованы синтетические пептиды, копирующие V1-, V2-, V3-петлю оболочечного белка gp 120 консенсусной

последовательности вирусов группы М ВИЧ1 и последовательности V3-петли
русского изолята RUA022a2. Было показано, что они распознаются
сыворотками ВИЧ-инфицированных людей, и способны вызывать
образование антител. Пептиды, в силу своего небольшого молекулярного веса,
обладают низкой иммуногенностью. Поэтому необходимо использовать
различные иммуноадаванты. В настоящее время большое внимание
уделяется адавантам, активизирующим клетки врожденного иммунитета, в
частности poly (I:C). poly (I:C) – синтетический аналог двуцепочечной РНК,
является лигандом для TLR3. Связывание poly (I:C) с TLR3 приводит к
выработке интерферон I типа, воспалительных цитокинов/хемокинов и
созревание дендритных клеток [9]. Использование этого адаванта в
пептидных вакцинах, способствовало развитию специфического клеточного
ответа на антигены [1].

Целью этой работы было исследование иммуногенности пептидов,
копирующих V3 петлю консенсусной последовательности вирусов группы М
ВИЧ1 и русского изолята RUA022a2, в зависимости от способа введения
(подкожно и внутрибрюшинно) и использования иммуноадаванта.

Материалы и методы

Синтетические пептиды. Синтетические пептиды, повторяющие
консенсусную последовательность V3- петли группы М и V3-петлю
русского изолята RUA022a2 оболочечного белка gp120 ВИЧ1,
синтезированные в ООО «НПФ Верта». Аминокислотная последовательность
V3-петли русского изолята RUA022a2 (MIM 14-3)
CIRPGNNTRTSIRIGPGQAFYATGEIIGDTRKANCTVN и V3-петли
консенсусной последовательности группы М
(EINSTRPNNNTRKSIRIGPGQAFYATGDIIGDIRQANHCNIS (MIM 11).

Иммунизация животных. Для работы были использованы мыши,
самки линии balb/c весом 16-18г из питомника «Столбовая» РАМН.
Животные содержались на стандартном рационе в условиях вивария РОНЦ
им. Н.Н. Блохина РАМН. В опытах использовали мышей, прошедших
карантинный режим вивария. Вся работа с лабораторными животными
проводилась в соответствии с «Правилами лабораторной практики в
Российской Федерации». Приказ Министерства здравоохранения и
социального развития Российской Федерации от 23.08.2010 № 708н г. Москва
«Об утверждении правил лабораторной практики». Животных
иммунизировали смесью пептидов (100 мкг каждого пептида на животное)
подкожно или внутрибрюшинно, в ФСБ или с синтетическим аналогом
двуцепочечной РНК poly (I:C), 3 раза с интервалом 2 недели. Образцы
сывороток крови отбирали после каждой иммунизации на 14 день после
первого и второго введения, и на 7 день после третьего. Селезенки отбирали и
выделяли спленоциты после третьего введения антигена на 7 день.

Постановка ИФА. Синтетические пептиды (MIM 11 и MIM 14-3)
сорбировали на полистироловых планшетах (Greiner) в концентрации 10
мкг/мл при комнатной температуре, 18 часов. Готовили ряд последовательных

двоичных разведений сывороток иммунизированных животных на 0,01 М фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,05% Твин-20 (ФСБ-Т) и 0,02% бычьего сывороточного альбумина (ФСБ-АТ). Образцы выдерживали 60 мин при 37° С. По окончании инкубации, лунки пятикратно отмывали ФСБ-Т. Добавляли антитела кролика к IgG мыши, меченные пероксидазой хрена (Sigma), или антителами кролика к IgM мыши (Sigma), меченные пероксидазой хрена, или антителами кролика к IgA мыши, меченные пероксидазой хрена в (ФСБ-АТ) и выдерживали 60 мин при 37° С. По окончании инкубации лунки отмывали ФСБ-Т 3 раза, вносили субстратный буферный раствор – ТМБ, выдерживали 15 минут. Реакцию останавливали 10% раствором серной кислоты. Учет реакции проводили при длине волны 450 нм.

Определение изотипа антител. Синтетические пептиды (MIM -11 и MIM 14-3) сорбировали на полистироловых планшетах (Greiner) в концентрации 10 мкг/мл при комнатной температуре, 18 часов. Вносили сыворотки в разведении 1:50 в ФСБ-АТ и инкубировали 1 час при 37°С. По окончании инкубации планшеты отмывали 3 раза ФСБ-Т, вносили антитела козы против изотипов антител мыши (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM) (Sigma) в разведении 1:1000 в ФСБ-АТ. Инкубировали 1 час при 37°С. Отмывали планшеты 3 раза ФСБ-Т и вносили конъюгат кроличьих антител против IgG козы, меченные пероксидазой хрена в рабочем разведении (Sigma) и выдерживали 60 мин при 37° С. По окончании инкубации лунки отмывали ФСБ-Т 3 раза, вносили субстратный буферный раствор – ТМБ, выдерживали 15 минут. Реакцию останавливали 10% раствором серной кислоты. Учет реакции проводили при длине волны 450 нм.

Выделение CD4⁺ клеток. Проводили из спленоцитов мышей, методом магнитной сепарации, используя коммерческий набор Dynabeads® Mouse CD4 (ThermoFisher Scientific)

Определение антиген-специфической продукции IL4, INF γ , IL10. Спленоциты или выделенные CD4⁺ клетки мышей вносили в лунки 24 луночного планшета (2,5 млн клеток/лунку) и инкубировали совместно с синтетическим пептидами, используемых для иммунизации, повторяющие консенсусную последовательность V3- петли группы М и V3-петлю российского изолята RUA022a2, в полной питательной среде. Стимулирующая концентрация была 5 мкг/мл каждого антигена. Контролем функциональной активности лимфоцитов служила стимуляция клеток конконовалином А (10 мкг/мл). Через 72 часа отбирали супернатант, центрифугировали его 10 минут при 1000 об/мин, отбирали надосадочную жидкость и хранили на -20 С до проведения ИФА. Цитокины определяли в коммерческих наборах (Mabtech) согласно приложенной инструкции.

Реакция нейтрализации. Реакцию ставили в полной питательной среде (DMEM, 10% FCS), содержащей 15 мкг/мл DEAE-dextran. Исследуемые сыворотки инактивировали прогреванием до 56°С в течении 1 часа. Готовили ряд разведений сывороток (1:10 – 1:160) в полной питательной среде с DEAE-dextran, далее добавляли сток псевдовиральных частиц вирусного изолята

QF495.23.M.EnvA1, в разведении соответствующему 50TCID₅₀. Плазмиды, необходимые для получения псевдовиральных частиц, были любезно предоставлены The National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Инкубировали 1 час в 5% атмосфере CO₂ при 37°C, по окончании инкубации вносили клетки линии TZM-bl (10⁴ клеток/лунку). Оставляли на 48 часов. Далее удаляли супернатант и отмывали лунки фосфатно-солевым буферным раствором. Затем добавляли лизирующий раствор (0,5% NP40 в ФСБ), оставляли на 15 мин при 37°C. Полученный лизат переносили в другой планшет и вносили раствор 2х CPRG (Roch) инкубировали 30 минут в темноте при комнатной температуре. Учитывали результаты при 540 нм.

Результаты

Иммуногенные свойства синтетических пептидов. Для оценки влияния способа введения и использования иммуноадаьюванта на развитие иммунного ответа, животных, мышей линии balb/c, иммунизировали смесью пептидов, подкожно или внутрибрюшинно, в смеси с poly(I:C) и без него. Иммунизацию проводили три раза. Иммунный ответ, образование IgG и IgM антител, определялся после каждого введения антигена. После первого и второго введения смотрели суммарный ответ на оба антигена, после третьего – на каждый антиген отдельно (таблица 1-4).

Как видно из таблиц 1-3, на формирование иммунного ответа, IgG антител, влияло использование иммуноадаьюванта, poly (I:C), а не способ введения. Так, после первого введения в группах без адьюванта, где антиген вводился п/к, лишь у 1 животного выявляются антитела, и отсутствуют в группе с в/б введением. В группах с иммуноадаьювантом антитела обнаруживаются у 4 из 8, при п/к введении, и у 3 из 8, при в/б. После второго введения, антитела обнаруживаются в группе без иммуноадаьюванта у 1 из 8 животных при п/к введении, и у 3 из 7 при в/б. В группе с poly (I:C) антитела выявляются при п/к у 8 из 8 животных, при в/б у 5 из 8. После третьей иммунизации антитела определяются во всех группах на оба антигена, входящие в состав смеси. Уровень антител, был незначительно выше в группах, где использовался poly (I:C).

Специфические антитела класса IgM выявлялись только после третьего введения антигена (таблица 4). На их титр не влиял способ введения, уровень антител, был также незначительно выше в группах, где использовался poly (I:C).

Определение изотипа антител. Для определения того, какой изотип антител образуется преимущественно при иммунизации, на твердую фазу сорбировали смесь пептидов. Далее вносили пулированные сыворотки после третьего введения в разведении 1:50 для каждой группы и конъюгаты против каждого изотипа антител. В качестве контроля использовали сыворотки интактных животных. Результаты учитывали, определяя отношение ОП иммунных групп к ОП негативных животных.

Как видно из рисунка наибольшая величина отношения ОП исследуемой сыворотки/ОП интактной была в лунках с анти IgG1 конъюгатом во всех

иммунных группах, преимущественно там, где использовался иммуноадьювант poly (I:C). Таким образом, способ введения антигенов (пептидов) не влиял на развитие изотипа антител.

Нейтрализующая активность антител, полученных на синтетические пептиды. Полученные в результате иммунизации сыворотки были исследованы на способность нейтрализовать ВИЧ. Исследование проводили на модели псевдовиральной инфекции, изолят - QF495.23.M.EnvA1, относящийся к африканскому субтипу А, выделенному от женщины, заразившейся ВИЧ половым путем. Данный изолят был выбран, т.к. на территории Российской Федерации циркулирует преимущественно вирусы, относящиеся к субтипу А. Инфекционная доза составила 50TCID₅₀, использовались пулированные сыворотки после третьего введения.

Как видно из таблицы 5, полученные в результате нейтрализации антитела не были способны нейтрализовать вирусные изоляты.

Активация клеточного звена иммунного синтетическими пептидами. Проведена оценка направленности иммунного ответа. Маркерами активации Th1 клеток является IFN γ , Th2 – IL4. Исследование проводилось как на общем пуле спленоцитах, так и на выделенных из них CD4⁺-лимфоцитах. Клетки иммунных животных стимулировали каждым пептидом, входящим в состав иммуногенной композиции, в течение 72 часов, и определяли продукцию ими цитокинов в культуральной среде методом ИФА. Стимуляция клеток (спленоцитов и CD4⁺) антигенами не вызывала продукции IL4. Уровень IL4 не отличается между группами иммунизированных и интактных животных (Таблица 6). Напротив, в группах, где использовался иммуноадьювант, стимуляция клеток (спленоцитов) антигенами, входящими в состав иммуногенной смеси приводила к синтезу ими IFN γ (Таблица 7). Количество выявленного IFN γ в этих группах 8-10 раз выше, по сравнению с группой интактных животных, и иммунизированных без иммуноадьюванта. Однако, совместное инкубирование антигенов с CD4⁺ клетками не приводила к продукции IFN γ последними.

Также в группах, где в составе иммуногенной композиции присутствовала poly (I:C), определялся низкий уровень противовоспалительного цитокина IL10, больше всего его выявлялось при внутрибрюшинном введении (Таблица 8).

Обсуждение

В данной работе нами проводилось изучение иммуногенных свойств синтетических пептидов, копирующих V3-петлю оболочечного белка gp120 российского изолята RUA022a2 и консенсусной последовательности группы М ВИЧ, при различных способах введения (подкожно и внутрибрюшинно). Способ введения антигена в организм влияет на пути активации иммунной

системы. Для того, чтобы вакцина вызывала иммунный ответ, необходима эффективная доставка антигена от места введения до вторичной лимфоидной ткани, где находятся антиген-представляющие клетки (АПК), В- и Т-клетки. Антигены могут непосредственно проникать в лимфоидные органы (селезенка и лимфоузлы) через интерстициальную жидкость и лимфатические сосуды. Также некоторые антигены могут быть доставлены АПК от места введения к лимфоузлам, для представления их Т-и В-клеткам [2,14]. Различия в развитии иммунного ответа, в зависимости от способа введения, было продемонстрировано в ряде исследований. Так, например, при оценке иммуногенности вектора на основе бакуловируса, продуцирующего белок р24 ВИЧ1, было показано, что внутрибрюшинное введение вызывает как антиген-специфическую пролиферацию Т-клеток, так и продукцию специфических антител. Кроме того, лимфопролиферативный ответ ограничивался пролиферацией спленоцитов, а не лимфоцитов из лимфоузлов. При подкожном и внутривенном введении активировалось только образование специфических антител. Отмечены различия и в динамике развития антител. После подкожного и внутрибрюшинного трехкратного введения наблюдался рост титров антител, однако при внутрибрюшинном введении уровень вышел на плато [4, 11].

В наших экспериментах было показано, что способ введения не влияет значительно на уровень развития специфических антител и не переключает синтез изотипа антител, однако в группах, где использовался иммуноадаъювант (poly (I:C)), антитела детектировались раньше. К сожалению, полученные антитела не обладали нейтрализующей активностью по отношению вирусного изолята QF495.23.M.EnvA1 в модели псевдовиральной инфекции. Возможно, синтетические пептиды полноценно не воспроизводят нейтрализующие эпитопы. Следует отметить, что и при естественной инфекции редко формируется полноценный нейтрализующий ответ, что еще раз подчеркивает сложность конструирования вакцинных эпитопов, способных повторять нейтрализующие эпитопы вируса.

При изучении способности пептидов вызывать активацию клеточного иммунного ответа было выявлено, что они сами по себе её не вызывают. Но в группах, где использовался иммуноадаъювант poly (I:C), выявлена антиген-специфическая продукция INF γ спленоцитами. Способ введения антигена также не влиял на развитие клеточного иммунного ответа. Стимуляция антигенами изолированных CD4⁺ -клеток не приводила к продукции ими цитокинов, что, вероятно, связано с отсутствием ко-стимулирующих сигналов со стороны других клеток иммунной системы.

Небольшое отличие было выявлено в продукции противовоспалительного цитокина IL-10. В группе, где антигены вводились внутрибрюшинно совместно с poly(I:C), этого цитокина определялось больше всего. Хотя считается, что IL-10 продуцируется Th2 клетками, в последнее время показано, что IL-10 Th1 эффекторные клетки также способны продуцировать его, тем самым ограничивая побочный эффект, вызванный воспалением [10].

265 Таким образом, проведенные нами исследования показали, что
266 использование иммуноадаьюванта poly (I:C) позволяет сократить срок между
267 введением антигена и образованием антител, а также вызвать антиген-
268 специфическую активацию Th1 клеток. Эти данные могут быть использованы
269 при дизайне вакцинных препаратов против ВИЧ-инфекции. Кроме того,
270 синтетические пептиды, копирующие V3 петлю оболочечного белка gp120
271 ВИЧ1, могут применяться как одни из компонентов анти-ВИЧ-вакцин,
272 например, в схеме иммунизации прайм-буст.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1 - Титр IgG антител после первой иммунизации (подкожно или внутривбрюшинно) синтетическими пептидами повторяющие консенсусную последовательность V3- петли группы М и V3-петлю российского изолята RUA022a2 оболочечного белка gp120 ВИЧ1, с адьювантом poly (I:C) и без *

Table 1 - IgG antibody titer after the first immunization (subcutaneously or intraperitoneally) with synthetic peptides that copy the V3 loop of envelope protein gp120 HIV1 of group M consensus sequence and Russian isolate RUA022a2, with adjuvant poly (I:C) and without it *

Животное Mouse	Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous Injection in PBS	Подкожное введение с poly (I:C) Subcutaneous Injection With poly (I:C)	Внутривбрюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal Injection in PBS	Внутривбрюшинное введение с poly (I:C) Intraperitoneal Injection With poly (I:C)
1	0	160	0	0
2	0	0	0	40
3	40	40	0	0
4	0	0	0	0
5	0	40	0	0
6	0	20	0	40
7	0	0	0	0
8	0	0	0	40

*Результаты представлены в виде разведения сывороток, дающих положительный ответ. Антиген на твердой фазе – смесь пептидов, входящих в состав иммуногенной смеси.

*The results are presented as serum dilutions that give a positive response. A solid-phase antigen is a mixture of peptides that are part of an immunogenic mixture.

Таблица 2 - Титр IgG антител после второй иммунизации (подкожно или внутривбрюшинно) синтетическими пептидами повторяющие консенсусную

последовательность V3- петли группы M и V3-петлю российского изолята RUA022a2 оболочечного белка gp120 ВИЧ1, с адъювантом poly (I:C) и без*

Table 2 - IgG antibody titer after the second immunization (subcutaneously or intraperitoneally) with synthetic peptides that copy the V3 loop of envelope protein gp120 HIV1 of group M consensus sequence and Russian isolate RUA022a2, with adjuvant poly (I:C) and without it *

Животное Mouse	Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous Injection in PBS	Подкожное введение с poly (I:C) Subcutaneous Injection With poly (I:C)	Внутрибрюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal Injection in PBS	Внутрибрюшинное введение с poly (I:C) Intraperitoneal Injection With poly (I:C)
1	0	160	0	0
2	0	40	0	40
3	40	20	0	0
4	0	20	40	40
5	0	40	160	20
6	0	20	20	80
7	0	40	0	20
8	0	20		0

*Результаты представлены в виде разведения сывороток, дающих положительный ответ. Антиген на твердой фазе – смесь пептидов, входящих в состав иммуногенной смеси.

*The results are presented as serum dilutions that give a positive response. A solid-phase antigen is a mixture of peptides that are part of an immunogenic mixture.

Таблица 3 - Титр IgG антител после третьей иммунизации (подкожно или внутривбрюшинно) синтетическими пептидами повторяющие консенсусную последовательность V3- петли группы М и V3-петлю российского изолята RUA022a2 оболочечного белка gp120 ВИЧ1*, с адьювантом poly (I:C) и без.

Table 3 - IgG antibody titer after the third immunization (subcutaneously or intraperitoneally) with synthetic peptides that copy the V3 loop of envelope protein gp120 HIV1 of group M consensus sequence and Russian isolate RUA022a2, with adjuvant poly (I:C) and without it *

Антиген на твердой фазе Solid-phase antigen	V3-петля консенсусной последовательности группы М V3 loop of the group M consensus sequence				V3-петля российского изолята RUA022a2 V3-loop of the Russian isolate RUA022a2			
Животное Mouse	Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous Injection in PBS	Подкожное введение с poly (I:C) Subcutaneous Injection With poly (I:C)	Внутривбрюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal Injection in PBS	Внутривбрюшинное введение с poly (I:C) Intraperitoneal Injection With poly (I:C)	Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous Injection in PBS	Подкожное введение с poly (I:C) Subcutaneous Injection With poly (I:C)	Внутривбрюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal Injection in PBS	Внутривбрюшинное введение с poly (I:C) Intraperitoneal Injection With poly (I:C)
1	40	160	40	40	20	20	10	80
2	40	80	160	80	20	40	40	160
3	160	320	40	80	160	160	20	160
4	80	160	80	160	20	160	80	160
5	160	160	80	40	40	80	20	2560
6	320	640	80	40	320	320	20	40
7	160	160	160	80	20	160	20	2560

8	20		160		20		20	
Средн ий геом. титр Geom etric mean titer	87,2	195,0	87,2	65,6	40,0	97,5	23,8	262,5

*Результаты представлены в виде разведения сывороток, дающих положительный ответ.

*The results are presented as serum dilutions that give a positive response

Таблица 4 - Титр IgM антител после третьей иммунизации (подкожно или внутривбрюшинно) синтетическими пептидами повторяющие консенсусную последовательность V3- петли группы M и V3-петлю российского изолята RUA022a2 оболочечного белка gp120 ВИЧ1, с адьювантом poly (I:C) и без*

Table 4 - IgM antibody titer after the third immunization (subcutaneously or intraperitoneally) with synthetic peptides that copy the V3 loop of envelope protein gp120 HIV1 of group M consensus sequence and Russian isolate RUA022a2, with adjuvant poly (I:C) and without it *

Антиген на твердой фазе Solid-phase antigen	V3-петля консенсусной последовательности группы М V3 loop of the group M consensus sequence				V3-петля российского изолята RUA022a2 V3-loop of the Russian isolate RUA022a2			
Животное Mouse	Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous Injection in PBS	Подкожное введение с poly (I:C) Subcutaneous Injection in PBS With poly (I:C)	Внутрибрюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal Injection in PBS	Внутрибрюшинное введение с poly (I:C) Intraperitoneal Injection With poly (I:C)	Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous Injection in PBS	Подкожное введение с poly (I:C) Subcutaneous Injection in PBS With poly (I:C)	Внутрибрюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal Injection in PBS	Внутрибрюшинное введение с poly (I:C) Intraperitoneal Injection With poly (I:C)
1	20	40	20	40	20	40	20	80
2	40	40	20	20	40	40	20	20
3	20	20	20	40	40	20	20	160
4	20	20	20	20	20	20	20	40
5	20	20	20	20	20	20	20	80
6	20	160	20	20	40	160	20	80
7	20	40	20	20	20	40	20	80
8	20		20		20		40	

Средн ий геом. титр Geom etric mean titer	21,8	36,2	20,0	24,4	25,9	36,2	21,8	65,6
--	------	------	------	------	------	------	------	------

*Результаты представлены в виде разведения сывороток, дающих
положительный ответ

*The results are presented as serum dilutions that give a positive response

Таблица 5 - Нейтрализующая активность сывороток животных, иммунизированных смесью синтетических пептидов

Table 5 – The serum neutralizing activity of the mice that were immunized with synthetic peptide mixture

Группа Group	Подкожное введение в ФСБ Subcutaneous Injection in PBS	Подкожное введение с poly (I:C) Subcutaneous Injection With poly (I:C)	Внутрибрюшинное введение в ФСБ Intraperitoneal Injection in PBS	Внутрибрюшинное введение с poly (I:C) Intraperitoneal Injection With poly (I:C)
IC50	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1
IC75	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1
IC90	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1

Таблица 6 – Продукция клетками (спленоцитами) IL4 животных, иммунизированных смесью синтетических пептидов, копирующих V3 петлю консенсусной последовательности группы М и российского изолята RUA022a2, в ФСБ и иммуноадаьювантом poly (I:C) *

Table 6 - IL4 production by cells (splenocytes) of animals immunized with synthetic peptides that copy the V3 loop of envelope protein gp120 HIV1 of group M consensus sequence and Russian isolate RUA022a2, with adjuvant poly (I:C) and without it*

Группа Group	Стимулирующий антиген Stimulating antigen	CD4 ⁺ клетки CD4 ⁺ cells	Спленоциты Splenocytes
п/к введение в ФСБ Subcutaneous Injection in PBS	MIM11	0,19	0,08
	MIM14-3	0,12	0,11
	Спонтанная Spontaneous	0,13	0,10
	Конканавалин А <i>Concanavalin A</i>	1,32	1,17
п/к введение в poly (I:C) Subcutaneous Injection With poly (I:C)	MIM11	0,09	0,24
	MIM14-3	0,10	0,15
	Спонтанная Spontaneous	0,10	0,17
	Конканавалин А <i>Concanavalin A</i>	1,20	0,97
в/б введение в ФСБ Intraperitoneal Injection in PBS	MIM11	0,19	0,08
	MIM14-3	0,11	0,11
	Спонтанная Spontaneous	0,13	0,10
	Конканавалин А	0,93	1,02

	<i>Concanavalin A</i>		
в/б введение	MIM11	0,09	0,25
в poly (I:C)	MIM14-3	0,09	0,16
Intraperitoneal	Спонтанная		
Injection	Spontaneous	0,07	0,18
With			
poly (I:C)	Конканавалин А <i>Concanavalin A</i>	1,25	1,14
Интактные	MIM11	0,24	0,10
Мыши	MIM14-3	0,15	0,13
Native	Спонтанная		
mice	Spontaneous	0,17	0,11
	Конканавалин А <i>Concanavalin A</i>	1,22	0,98

*Результаты представлены в виде содержания цитокина в супернатанте (пкг /мл)

*Results are presented as cytokine content in the supernatant (pg/ml)

Таблица 7 - Продукция клетками (спленоцитами) INF γ животных, иммунизированных смесью синтетических пептидов, копирующих V3 петлю консенсусной последовательности группы М и российского изолята RUA022a2, в ФСБ и иммуноадаьювантом poly (I:C) *

Table 7 - INF γ production by cells (splenocytes) of animals immunized with synthetic peptides that copy the V3 loop of envelope protein gp120 HIV1 of group M consensus sequence and Russian isolate RUA022a2, with adjuvant poly (I:C) and without it*

Группа Group	Стимулирующий антиген Stimulating antigen	CD4 ⁺ клетки CD4 ⁺ cells	Спленоциты Splenocytes
п/к введение в ФСБ Subcutaneous Injection in PBS	MIM11	1,19	0,51
	MIM14-3	0,79	0,60
	Спонтанная Spontaneous	0,88	0,49
	Конканавалин А <i>Concanavalin A</i>	12,74	14,49
п/к введение в poly (I:C) Subcutaneous Injection With poly (I:C)	MIM11	0,45	11,84
	MIM14-3	0,58	12,14
	Спонтанная Spontaneous	0,50	11,24
	Конканавалин А <i>Concanavalin A</i>	14,02	15,20
в/б введение в ФСБ Intraperitoneal Injection in PBS	MIM11	1,15	0,46
	MIM14-3	0,74	0,54
	Спонтанная Spontaneous	0,81	0,51
	Конканавалин А	10,43	14,43

	<i>Concanavalin A</i>		
в/б введение	MIM11	0,45	8,61
в poly (I:C)	MIM14-3	0,56	6,67
Intraperitoneal	Спонтанная		
Injection	Spontaneous	0,47	3,02
With			
poly (I:C)	Конканавалин А <i>Concanavalin A</i>	14,60	15,02
	MIM11	1,10	0,80
Интактные	MIM14-3	0,74	1,02
Мыши	Спонтанная		
Native	Spontaneous	0,79	2,00
mice	Конканавалин А <i>Concanavalin A</i>	11,37	15,06

* Результаты представлены в виде содержания цитокина в супернатанте (пкг /мл)

* Results are presented as cytokine content in the supernatant (pg/ml)

Таблица 8 – Продукция клетками (спленоцитами) IL10 животных иммунизированных смесью синтетических пептидов, копирующих V3 петлю консенсусной последовательности группы М и российского изолята RUA022a2, в ФСБ и иммуноадаьювантом poly (I:C) *

Таблица 8 – IL10 production by cells (splenocytes) of animals immunized with synthetic peptides that copy the V3 loop of envelope protein gp120 HIV1 of group M consensus sequence and Russian isolate RUA022a2, with adjuvant poly (I:C) and without it*

Группа Group	Стимулирующий антиген Stimulating antigen	Спленоциты Splenocytes
п/к введение в ФСБ Subcutaneous Injection in PBS	MIM11	0
	MIM14-3	0
	СПОНТ	0
	кон А	1,46
п/к введение в poly (I:C) Subcutaneous Injection With poly (I:C)	MIM11	1,71
	MIM14-3	0,05
	СПОНТ	0,19
	кон А	2,84
в/б введение в ФСБ Intraperitoneal Injection in PBS	MIM11	0
	MIM14-3	0
	СПОНТ	0
	кон А	1,19
в/б введение в poly (I:C)	MIM11	2,48
	MIM14-3	1,37

Intraperitoneal Injection With poly (I:C)	СПОНТ	0,39
	кон А	2,37
Интактные Мыши Native mice	MIM11	0
	MIM14-3	0,048
	СПОНТ	0
	кон А	2,5

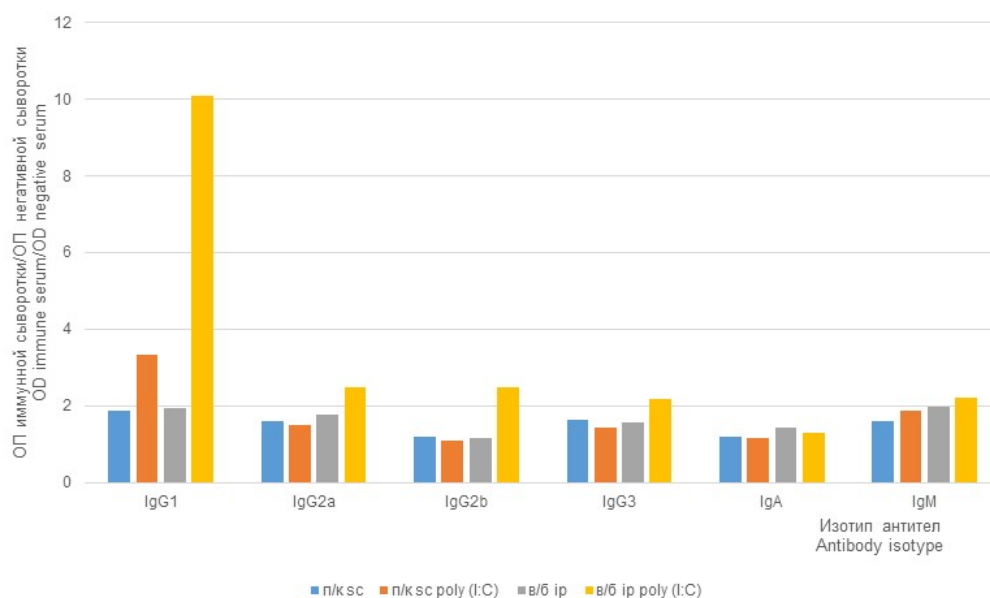
* Результаты представлены в виде содержания цитокина в супернатанте (пкг /мл)

* Results are presented as cytokine content in the supernatant (pg/ml)

РИСУНКИ

Рисунок 1 – Изотип антител, индуцированных синтетическими пептидами, повторяющими консенсусную последовательность V3-петли группы М и V3-петлю российского изолята RUA022a2 оболочечного белка gp120 ВИЧ1, с адъювантом poly (I:C) и без, после третьего введения подкожно или внутривенно

Figure 1 - Isotype of induced by synthetic peptides antibodies that copy the V3 loop of envelope protein gp120 HIV1 of group M consensus sequence and Russian isolate RUA022a2, with adjuvant poly (I:C) and without it, after the third injection subcutaneously or intraperitoneally



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Коробова Светлана Вячеславовна, к.б.н., старший научный сотрудник;

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе д.24, корп.2;

факс: 8(499)618-71-56;

телефон: 8(906)706-47-67;

e-mail: korobovas@gmail.com

Korobova Svetlana Vyacheslavovna, Ph.D, senior researcher;

address: 24 b.2 Kashirskoye shosse, Moscow, Russia, 115478;

fax: 8(499)618-71-56;

telephone: 8(906)706-47-67;

e-mail: korobovas@gmail.com

Блок 2. Информация об авторах

Коробова Светлана Вячеславовна, к.б.н., старший научный сотрудник;

Korobova Svetlana Vyacheslavovna, PhD, senior researcher;

Топорова Виктория Александровна, н.с.;

Toporova Victoria Aleksandrovna, scientist researcher;

Алхазова Биана Игоревна, младший научный сотрудник;

Alkhazova Biana Igorevna, junior researcher;

Головина Марина Эдуардовна, к.б.н., ведущий научный сотрудник;

Golovina Marina Eduardovna, PhD, leading researcher;

Апарин Петр Геннадьевич, д.м.н., зав. Лабораторией;

Aparin Petr Gennad'evich, PhD, head of laboratory.

Блок 3. Метаданные статьи

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ, ПОВТОРЯЮЩИХ V3 ПЕТЛЮ ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА GP 120 ВИЧ 1, ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИИ ИММУНОАДЬЮВАНТА POLY (I:C)

IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF SYNTHETIC PEPTIDES THAT COPY V3 LOOP REGION OF THE HIV-1 GP120 ENVELOPE PROTEIN WITH VARIOUS METHOD OF ADMINISTRATION AND POLY (I:C) IMMUNOADJUVANT USE

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ПЕПТИДЫ ВИЧ И ИММУНОАДЬЮВАНТ

HIV PEPTIDES AND ADJUVANT

Ключевые слова: ВИЧ, пептиды, вакцина, нейтрализующие антитела, иммуноадьюванты, poly (I:C), мыши.

Keywords: HIV, peptides, vaccine, neutralizing antibodies, immunoadjuvants, poly (I:C), mice,

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 7,

Количество таблиц – 8,

Количество рисунков – 1.

16.09.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Поряд- ковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Барышникова М.А., Пономарев А.В., Рудакова А.А., Соколова З.А., Голубцова Н.В., Царапаев П.В., Левагина Г.М., Даниленко Е.Д., Косоруков В.С. Сравнение Ридостина Про и Poly(I:C) в качестве адьюванта для противоопухолевой неоантигенной пептидной вакцины. <i>Российский биотерапевтический журнал</i> . 2022;21(3):82-89.	Baryshnikova M.A., Ponomarev A.V., Rudakova A.A., Sokolova Z.A., Golubtsova N.V., Tsarapaev P.V., Levagina G.M., Danilenko E.D., Kosorukov V.S. Comparison of Ridostin Pro and Poly(I:C) as adjuvant for a cancer neoantigen peptide vaccine. <i>Russian Journal of Biotherapy</i> . 2022;21(3):82-89. (In Russ.)	doi: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-82-89
2	Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control		doi: 10.1038/32588

	of immunity. Nature. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.		
3	Corey L, Gilbert PB, Juraska M, Montefiori DC, Morris L, Karuna ST, Edupuganti S, Mgodhi NM, deCamp AC, Rudnicki E, Huang Y, Gonzales P, Cabello R, Orrell C, Lama JR, Laher F, Lazarus EM, Sanchez J, Frank I, Hinojosa J, Sobieszczyk ME, Marshall KE, Mukwekwerere PG, Makhema J, Baden LR, Mullins JI, Williamson C, Hural J, McElrath MJ, Bentley C, Takuva S, Gomez Lorenzo MM, Burns DN, Espy N, Randhawa AK, Kochar N, Piwowar-Manning E, Donnell DJ, Sista N, Andrew P, Kublin JG, Gray G, Ledgerwood JE, Mascola JR, Cohen MS; HVTN 704/HPTN 085 and HVTN 703/HPTN 081 Study Teams. Two Randomized Trials of Neutralizing Antibodies to		doi: 10.1056/NEJMoa2031738.

	Prevent HIV-1 Acquisition. N Engl J Med. 2021 Mar 18;384(11):1003-1014.		
4	Fyfe L, Maingay J, Robinson AC, Howie SE. Murine immune response to HIV-1 p24 core protein following subcutaneous, intraperitoneal and intravenous immunization. Immunology. 1991 Nov;74(3):467-72. PMID: 1769693; PMCID: PMC1384641.		https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1384641/
5	Ivanoff LA, Dubay JW, Morris JF, Roberts SJ, Gutshall L, Sternberg EJ, Hunter E, Matthews TJ, Petteway SR Jr. V3 loop region of the HIV-1 gp120 envelope protein is essential for virus infectivity. Virology. 1992 Apr;187(2):423-32.		doi: 10.1016/0042-6822(92)90444-t. PMID: 1546447.
6	Kirby KA, Ong YT, Hachiya A, Laughlin TG, Chiang LA,		doi: 10.1096/fj.14-252262.

	Pan Y, Moran JL, Marchand B, Singh K, Gallazzi F, Quinn TP, Yoshimura K, Murakami T, Matsushita S, Sarafianos SG. Structural basis of clade-specific HIV-1 neutralization by humanized anti-V3 monoclonal antibody KD-247. FASEB J. 2015 Jan;29(1):70-80		
7	Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, Moodley E, Reddy S, de Pierres C, Mncube Z, Mkhwanazi N, Bishop K, van der Stok M, Nair K, Khan N, Crawford H, Payne R, Leslie A, Prado J, Prendergast A, Frater J, McCarthy N, Brander C, Learn GH, Nickle D, Rousseau C, Coovadia H, Mullins JI, Heckerman D, Walker BD, Goulder P. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant		doi: 10.1038/nm1520.

	associations with viral load. Nat Med. 2007 Jan;13(1):46-53.		
8	Liao HX, Sutherland LL, Xia SM, Brock ME, Scearce RM, Vanleeuwen S, Alam SM, McAdams M, Weaver EA, Camacho Z, Ma BJ, Li Y, Decker JM, Nabel GJ, Montefiori DC, Hahn BH, Korber BT, Gao F, Haynes BF. A group M consensus envelope glycoprotein induces antibodies that neutralize subsets of subtype B and C HIV-1 primary viruses. Virology. 2006 Sep 30;353(2):268-82.		doi: 10.1016/j.virol.2006.04.043
9	Matsumoto M, Seya T. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). Adv Drug Deliv Rev. 2008 Apr 29;60(7):805-12.		doi: 10.1016/j.addr.2007.11.005

10	O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. Nat Rev Immunol. 2007 Jun;7(6):425-8.		doi: 10.1038/nri2097
11	Schmidt ST, Khadke S, Korsholm KS, Perrie Y, Rades T, Andersen P, Foged C, Christensen D. The administration route is decisive for the ability of the vaccine adjuvant CAF09 to induce antigen-specific CD8(+) T-cell responses: The immunological consequences of the biodistribution profile. J Control Release. 2016 Oct 10;239:107-17.		doi: 10.1016/j.jconrel.2016.08.034
12	Siljic M, Cirkovic V, Jovanovic L, Antonova A, Lebedev A, Ozhmegova E, Kuznetsova A, Vinogradova T, Ermakov A, Monakhov N, Bobkova M, Stanojevic M. Reconstructing the Temporal Origin and the Transmission		doi: 10.3390/v14122748

	Dynamics of the HIV Subtype B Epidemic in St. Petersburg, Russia. Viruses. 2022 Dec 9;14(12):2748		
13	Zolla-Pazner S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. Nat Rev Immunol. 2004 Mar;4(3):199-210.		doi: 10.1038/nri1307
14	von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. Nat Rev Immunol. 2003 Nov;3(11):867-78		doi: 10.1038/nri1222