ПОЛУЧЕНИЕ ХИМЕРНЫХ ВАРИАНТОВ HBcAg, ЭКСПОНИРУЮЩИХ ФРАГМЕНТЫ MPER ВИЧ-1

Андрей Павлович РУДОМЕТОВ, Надежда Борисовна РУДОМЕТОВА,
Борис Николаевич ЗАЙЦЕВ, Леонид Рудольфович ЛЕБЕДЕВ,
Александр Алексеевич ИЛЬИЧЕВ, Лариса Ивановна КАРПЕНКО

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
630559, р. п. Кольцово Новосибирской области*

Эпидемия ВИЧ-1 является одной из самых острых проблем мирового здравоохранения. По ряду причин эффективной вакцины против этой инфекции на данный момент не создано. В настоящее время важным направлением в разработке вакцины против ВИЧ/СПИДа является конструирование иммуногенов, которые были бы способны индуцировать антитела, нейтрализующие широкий спектр штаммов ВИЧ-1 (bNAbs). Одним из подходов создания таких иммуногенов является конструирование химерных вирусоподобных частиц (VLPs), экспонирующих эпитопы, узнаваемые bNAbs. Целью исследования являлись получение и характеристика химерных VLPs на основе HBcAg, экспонирующих эпитопы, узнаваемые bNAbs 2F5 и 4E10. **Материал и методы.** Штаммы-продуценты химерных вариантов HBcAg получали путем трансформации клеток *Escherichia coli* BL21 рекомбинантными плазмидами, несущими гены *HBcAg* и содержащими вставки, кодирующие эпитопы bNAbs 2F5 и 4E10. Очистку рекомбинантных белков проводили с помощью гель-фильтрации на колонке с сефарозой CL-6B. Способность рекомбинантного HBcAg образовывать вирусоподобные частицы оценивали с помощью электронной микроскопии. Антигенные свойства эпитопов в составе химерных вариантов HBcAg анализировали с помощью иммуноблоттинга. **Результаты.** Получена модифицированная нуклеотидная последовательность гена *HBcAg*, в состав которой были введены уникальные сайты рестрикции, фланкирующие район главной антигенной детерминанты коры. На основе данной генетической конструкции получены три рекомбинантные плазмиды, кодирующие химерные варианты HBcAg, включающие эпитопы bNAbs 2F5 и 4E10. С помощью иммуноблоттинга установлено, что эпитопы, узнаваемые bNAbs, сохраняют свои антигенные свойства в составе химерных HBcAg.

Ключевые слова: ВИЧ-1, антигены, рекомбинантный HBcAg, рекомбинантные иммуногены, bNAbs, MPER.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта (грант № 18-44-543017).

Автор для переписки: Рудометов А.П., e-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru

Для цитирования: Рудометов А.П., Рудометова Н.Б., Зайцев Б.Н., Лебедев Л.Р., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Получение химерных вариантов HBcAg, экспонирующих фрагменты MPER ВИЧ-1. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (4): 55–61. doi: 10.15372/SSMJ20190407.

OBTAINING CHIMERIC VARIANTS HBcAg EXPOSING HIV-1 MPER FRAGMENTS

Andrey Pavlovich RUDOMETOV, Nadezhda Borisovna RUDOMETOVA,
Boris Nikolaevich ZAYTSEV, Leonid Rudol'fovich LEBEDEV,
Alexander Alekseevich ILYICHEV, Larisa Ivanovna KARPENKO

*State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor
630559, Koltsovo, Novosibirsk region*

The HIV-1 epidemic is one of the most acute global health problems. For several reasons, an effective vaccine against this infection has not yet been created. Currently, an important direction in the development of a vaccine against HIV / AIDS is the design of immunogens that would be able to induce antibodies that neutralize a high diversity of HIV-1 strains (bNAbs). One approach to creating such immunogens is the construction of chimeric virus-like particles (VLPs) exposing epitopes recognized by bNAbs. The aim of the study was to obtain and characterize chimeric VLPs based on HBcAg, exposing epitopes recognized by bNAbs 2F5 and 4E10. **Material and methods.** The producing strains of

chimeric HBcAg variants were obtained by transforming *E. coli* BL21 cells with recombinant plasmids carrying the HBcAg genes and containing insertions encoding bNAbs epitopes 2F5 and 4E10. Purification of recombinant proteins was performed using gel filtration on a sepharose CL-6B column. The ability of recombinant HBcAg to form virus-like particles was assessed using electron microscopy. Analysis of the antigenic properties of epitopes in the composition of chimeric variants of HBcAg was performed using immunoblotting. **Results.** A modified nucleotide sequence of the HBcAg gene was obtained, which included the introduction of unique restriction sites flanking the region of the main antigenic determinant of the core. Based on this genetic construct, three recombinant plasmids encoding chimeric HBcAg variants, including epitopes of bNAbs 2F5 and 4E10, were obtained. Using immunoblotting, it was found that epitopes recognized by bNAbs retain their antigenic properties after insertion into the HBcAg.

Key words: HIV-1, antigens, recombinant HBcAg, recombinant immunogens, bNAbs, MPER.

Conflict of interests. Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Acknowledgments. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research and the government of The Novosibirsk region, grant № 18-44-543017.

Correspondence author: Rudometov A. P., e-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru

Citation: Rudometov A.P., Rudometova N.B., Zaytsev B.N., Lebedev L.R., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. Obtaining chimeric variants HBcAg exposing HIV-1 MPER fragments. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (4): 55–61. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190407.

Эпидемия ВИЧ-1 является одной из самых острых проблем мирового здравоохранения. По ряду причин, основной из которых является высокая вариабельность ВИЧ-1, эффективной вакцины против этой инфекции на данный момент не создано. В настоящее время одним из важных направлений в разработке вакцины против ВИЧ/СПИДа является создание иммуногенов, которые были бы способны индуцировать антитела, нейтрализующие широкий спектр гетерологичных вариантов ВИЧ-1 (broadly neutralizing antibodies, bNAbs) [6, 13]. bNAbs нацелены на пять областей Env ВИЧ-1: 1) сайт связывания вируса с клеточным рецептом CD4; 2) протеогликановый фрагмент V2 на верхней части поверхностного тримера Env; 3) фрагмент протеогликана V3 на маннозном участке; 4) мембранно-проксимальная внешняя область (MPER) трансмембранного домена Env; 5) поверхность gp120/gp41 [15].

На данный момент одно из наиболее активно развивающихся направлений по дизайну иммуногенов, связанных с индукцией bNAbs, заключается в разработке тримеров gp120/gp41 [9, 16]. Несмотря на значительный прогресс в этом направлении, возникли определенные проблемы, требующие их решения. Во-первых, несмотря на то, что тримеры относительно стабильны в растворе, они продуцируют конформационные состояния, которые не способны обеспечить связывание и индукцию bNAbs. Во-вторых, тримеры экспонируют нежелательные иммунодоминантные непротективные эпитопы ВИЧ, которые могут отвлекать адаптивный иммунный ответ от распознавания нейтрализующих эпитопов [16, 21].

Альтернативным подходом создания ВИЧ-иммуногенов является конструирование химерных вирусоподобных частиц (virus-like particles, VLPs), экспонирующих отдельные эпитопы, узнаваемые bNAbs [7]. VLPs получают на основе вирусных структурных белков, обладающих способностью к самосборке [8]. Большинство VLPs имеют диаметр от 20 до 100 нм, т.е. размер, который позволяет свободно проникать в лимфатические сосуды и эффективно поглощаться антигенпрезентирующими клетками [14]. Эпитопы, представленные на поливалентных VLPs, могут перекрестно взаимодействовать с рецепторами В-клеток, что приводит к стимуляции и индукции устойчивого и длительного гуморального иммунного ответа [11, 24]. Данные особенности VLPs имеют важное значение для их использования в качестве носителей чужеродных антигенов [7]. Одним из успешных примеров таких VLPs является коровий антиген вируса гепатита В (HBcAg) [4, 19]. HBcAg образует частицу размером около 36 нм, состоящую из 240 копий HBcAg, собранных в виде 120 гомодимеров. Коровые частицы обеспечивают высокую иммуногенность включенных в их состав чужеродных антигенов [20].

В данной работе для конструирования ВИЧ-иммуногенов на основе HBcAg мы выбрали эпитопы, входящие в состав региона MPER ВИЧ-1 и узнаваемые bNAbs 2F5 и 4E10 [17, 18].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Моноклональные антитела, штаммы бактерий, плазмиды, ферменты. Моноклональные антитела (МКА) 2F5 (№ 1475) и 4E10 (№ 10091)

были получены в рамках программы предоставления реактивов NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (США). Штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen) был предоставлен отделом «Коллекции микроорганизмов» Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия). Эндонуклеазы рестрикции BamHI, PspLI, FauNDI, Sfr274I и T4 ДНК-лигаза были приобретены в компании «СибЭнзим» (Новосибирск).

Конструирование генов рекомбинантных белков. Оптимизацию кодового состава гена HBcAg проводили с помощью онлайн-ресурса «GenScript» (<https://www.genscript.com/>). Олигонуклеотиды, кодирующие эпитопы bNAbs, рассчитывали с использованием программы «SnapGene 3.2.1». Ген, кодирующий оптимизированный белок HBcAg, и олигонуклеотиды были синтезированы компанией «Евроген» (Москва). Ген HBcAg был клонирован в составе плазмидного вектора pET21a («Novagen», США) по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции FauNDI и Sfr274I.

Структуры целевых плазмид (pET-HBcAg, pET-HBcAg-2F5, pET-HBcAg-4E10 и pET-HBcAg-4E10CRF63) подтверждали секвенированием в ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск).

Наработка и очистка рекомбинантных белков. Бактериальные штаммы-продуценты рекомбинантных белков (HBcAg, HBcAg-2F5, HBcAg-4E10 и 4E10CRF63) получали путем трансформации компетентных клеток *E. coli* BL21 (DE3) pLysS соответствующими плазмидами. Биомассу наращивали как описано ранее [2]. Клетки разрушали с использованием ультразвукового гомогенизатора и отделяли растворимые белки от дебриса путем центрифугирования. Очистку проводили с помощью фракционирования растворимых белков на колонке (1,5 × 37 см) с CL-6B-сефарозой. Использовали натрий-фосфатный буфер (PBS), pH 7,6. Степень очистки целевого белка оценивали с помощью электрофореза по Леммли в 15%-м полиакриламидном геле (SDS-PAGE) с последующей фиксацией и окрашиванием Кумасси G250.

Электронная микроскопия частиц HBcAg. Для изучения размеров и формы вирусоподобных частиц использовали метод негативного контрастирования. Препараты рекомбинантного HBcAg адсорбировали на сеточках с формваровой подложкой в течение 1–2 мин и окрашивали 2%-м водным раствором уранилацетата. Визуализацию проводили с использованием электронного микроскопа «JEM100C» («Jeol», Япония).

Дот-блот анализ. Дот-блот анализ проводили с использованием системы «SNAP i.d.» («Millipore», США) как описано ранее [2]. На нитроцеллюлозную мембрану («Amersham», Австрия) наносили очищенные белки HBcAg-2F5, HBcAg-4E10 и HBcAg-4E10CRF63 (стартовая концентрация 0,1 мг/мл). HBcAg без встройки в той же концентрации использовали как отрицательный контроль. В качестве первичных антител были использованы МКА 2F5 и 4E10, разбавленные в блокирующем буфере (PBS, 1 % бычьего сывороточного альбумина) в соотношении 1 : 10000. Для проявления применяли антитела кролика против IgG человека («Sigma», США), конъюгированные с щелочной фосфатазой и разбавленные в блокирующем буфере в соотношении 1 : 5000. Визуализацию иммунного комплекса проводили добавлением NBT/BCIP-субстратного раствора («Sigma»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что основной иммунодоминантный район HBcAg находится в области 76–82 аминокислотных остатков (а.о.) (петля e1) [20, 23]. В ряде работ показано, что чужеродная последовательность, встроенная во внутреннюю область 75–83 а.о. петли HBcAg, является значительно более антигенной и иммуногенной, чем та же последовательность, расположенная на N-или C-конце белка-носителя [20, 23]. Ранее продемонстрирована возможность сборки химерных частиц HBcAg при внедрении широкого спектра чужеродных эпитопов [20]. Тем не менее существуют данные о том, что ряд эпитопов, встроенных в HBcAg, нарушают сборку коровых частиц и уменьшают уровень экспрессии рекомбинантного гена [1, 10, 12].

Ранее нами получен химерный HBcAg, несущий линейный миметик эпитопа и узнаваемый широконейтрализующим ВИЧ-1 МКА VRC01 [3]. В качестве вектора использована рекомбинантная плаزمида pUC/HBcAg, содержащая один уникальный сайт рестрикции в области главной антигенной детерминанты HBcAg. Это создает трудности для клонирования чужеродных ДНК-последовательностей. Также в ходе исследований установлено, что рекомбинантный белок находится в тельцах включения, что затрудняет очистку и требует рефолдинга рекомбинантного HBcAg. Поэтому в начале данной работы в состав гена HBcAg мы ввели три уникальных сайта рестрикции BamHI, MspI и PspLI, что позволяет включать пептиды в область петли e1 HBcAg путем замены участков, соответствующих 79–83 (BamHI и MspI) или 79–87 (BamHI и PspLI) а.о. кора. Кро-

Рис. 1. SDS-PAGE растворимых белков лизатов клеток *E. coli* BL21, несущих плазмиду pET-HBcAg: 1 – образец до разделения на колонке; 2–16 – фракции, полученные при гель-фильтрации на колонке с сефарозой CL-6B; 17 – маркеры молекулярных масс

Fig. 1. SDS-PAGE of soluble proteins of lysates of *E. coli* BL21 cells carrying the pET-HBcAg plasmid: 1 – sample before separation on a column; 2–16 – fractions obtained by gel filtration on a column with sepharose CL-6B; 17 – molecular weight markers

ме того, была проведена оптимизация кодонного состава гена *HBcAg* для эффективной экспрессии в системе *E. coli*. Модифицированный ген был синтезирован и клонирован в составе плазмидного вектора pET21a, рекомбинантную плазмиду назвали pET-HBcAg и трансформировали ею компетентные клетки *E. coli* BL21 для получения штамма-продуцента. Полученную биомассу гомогенизировали, разделяли на растворимую и нерастворимую фракции центрифугированием и исследовали на присутствие рекомбинантных белков с помощью SDS-PAGE; целевой белок обнаруживался в растворимой фракции. Его очищали с помощью гель-фильтрации на колонке с сефарозой CL-6B и показали, что целевой белок выходит в свободном объеме (рис. 1, фракции 2–7). Так как предел исключения сефарозы CL-6B составляет 4×10^6 Да, можно предположить, что исследуемый белок формирует частицы, имеющие высокую молекулярную массу, значительно большую, чем мономер HBcAg.

Для подтверждения того, что очищенный рекомбинантный HBcAg образует вирусоподобные частицы, был проведен анализ объединенных фракций (см. рис. 1, фракции 3–6) с помощью электронной микроскопии. На электронной микрофотографии видно, что полученный рекомбинантный HBcAg формирует VLPs (рис. 2).

Полученный плазмидный вектор pET-HBcAg был использован для клонирования олигонуклеотидных дуплексов, кодирующих

Рис. 2. Электронная микрофотография очищенного препарата рекомбинантного HBcAg. Негативное контрастирование уранилацетатом, масштаб 100 нм

Fig. 2. Electron micrograph of the purified recombinant HBcAg preparation. Negative contrasting with uranyl acetate, scale 100 nm

эпитопы – 2F5 (NEQELLELDKWASLWN), 4E10 (NWFDITNWLWYIK) и 4E10CRF63 (NWFDISNWLWYIK). Эпитопы 2F5 и 4E10 являются консенсусными последовательностями, они были взяты из базы данных <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>. Эпитоп 4E10CRF63 соответствует 671–683 а.о. env штамма ВИЧ-1 рекомбинантной формы CRF063_02A1, доминирующей на территории Новосибирской области [5, 22]. В результате клонирования получены три рекомбинантные плазмиды (pET-HBcAg-2F5, pET-HBcAg-4E10 и pET-HBcAg-4E10CRF63), кодирующие химерные варианты HBcAg со встроенными эпитопами в районе главной антигенной детерминанты кора. С помощью SDS-PAGE показано, что в клетках *E. coli*, трансформированных полученными плазмидами, синтезируются белки, по электрофоретической подвижности соответствующие теоретически рассчитанной молекулярной массе (23,4 кДа для HBcAg-2F5, 23,2 кДа для HBcAg-4E10 и HBcAg-4E10CRF63) (рис. 3, а).

Для исследования антигенных свойств белков HBcAg-2F5, HBcAg-4E10 и HBcAg-4E10CRF63 выполнен дот-блот анализ с использованием МКА 4E10 и 2F5, в качестве контроля использовали рекомбинантный HBcAg без вставки. Анализ подтвердил, что МКА 2F5 распознают соответствующий эпитоп в составе HBcAg-2F5 и не взаимодействует с HBcAg-4E10, HBcAg-4E10CRF63 и HBcAg без вставки. МКА 4E10 эф-

Рис. 3. а – электрофореграмма лизатов клеток *E. coli* BL21 (DE3) pLysS: 1 – лизат клеток без плазмиды; 2–4 – клетки *E. coli* BL21, несущие плазмиды pET-HBcAg-2F5, pET-HBcAg-4E10 и pET-HBcAg-4E10CRF63 соответственно; 5 – маркер молекулярной массы M31 («СибЭнзим», Россия); 6–8 – очищенные белки HBcAg-2F5, HBcAg-4E10 и HBcAg-4E10CRF63 соответственно; б – дот-блот анализ взаимодействия МКА 2F5 и 4E10 с рекомбинантными белками в HBcAg-2F5 (1), HBcAg-4E10 (2), HBcAg-4E10CRF63 (3) и HBcAg без встройки (4)

Fig. 3. а – electrophoregram of cell lysates of *E. coli* BL21 (DE3) pLysS: 1 – cell lysate without plasmid; 2–4 *E. coli* BL21 cells carrying plasmids pET-HBcAg-2F5, pET-HBcAg-4E10 and pET-HBcAg-4E10CRF63, respectively; 5 – molecular weight marker M31 (“SibEnzyme”, Russia); 6–8 – purified HBcAg-2F5, HBcAg-4E10 and HBcAg-4E10CRF63 proteins, respectively; б – dot blot analysis of the interaction of MAbs 2F5 and 4E10 with recombinant proteins in HBcAg-2F5 (1), HBcAg-4E10 (2), HBcAg-4E10CRF63 (3) and HBcAg without embedding (4)

фективно связывается с HBcAg-4E10 и HBcAg-4E10CRF63 и не узнает HBcAg-2F5 и исходный HBcAg (рис. 3, б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Преодолеть необычайное генетическое и, следовательно, экстремальное антигенное разнообразие ВИЧ-1, возможно, позволит создание иммуногена, способного индуцировать синтез антител, которые бы обладали нейтрализующей активностью против множества циркулирующих штаммов вируса.

В данной работе представлены результаты экспериментов по созданию ВИЧ-иммуногенов, несущих эпитопы, узнаваемые bNAbs 2F5 и 4E10, с использованием в качестве белка-носителя HBcAg. Сконструирован плазмидный вектор, содержащий ген HBcAg, в состав которого были введены уникальные сайты рестрикции, что позволяет получать химерные VLPs, несущие чужеродные эпитопы в районе главной антигенной детерминанты коры. На основе данной генетической конструкции получены три рекомбинантные плазмиды, кодирующие химерные варианты HBcAg, включающие эпитопы bNAbs 2F5 и 4E10. С помощью иммуноблотинга установлено, что эпитопы, узнаваемые bNAbs, сохраняют свои антигенные свойства в составе химерных

HBcAg. Полученные рекомбинантные белки могут рассматриваться как перспективные ВИЧ-иммуногены и в дальнейшем будут исследованы на способность индуцировать вирус-нейтрализующие антитела у лабораторных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карпенко Л.И., Иванисенко В.А., Пика И.А., Чикаев Н.А., Ерошкин А.М., Меламед Н.В., Веремейко Т.А., Ильичев А.А. Анализ чужеродных эпитопов, встроенных в HBcAg. Возможные пути решения проблемы самоорганизации химерных коровых частиц. *Молекул. биология*. 2000; 34 (2): 223–229.

Karpenko L.I., Ivanisenko V.A., Pika I.A., Chikaev N.A., Eroshkin A.M., Melamed N.V., Veremeyko T.A., Il'ichev A.A. Analysis of foreign epitope inserts in HBcAg. Approaches to solving the problem of core particle self-assembly. *Mol. Biol. (Mosc.)* 2000; 34 (2): 194–199.

2. Рудометов А.П., Андреева Н.Б., Чикаев А.Н., Щербактова Н.С., Каплина О.Н., Карпенко Л.И. Антигенные свойства искусственного полиэпитопного ВИЧ-иммуногена. *Сиб. науч. мед. журн.* 2018; 8 (4): 37–43.

Rudometov A.P., Andreeva N.B., Chikaev A.N., Shcherbakova N.S., Kaplina O.N., Karpenko L.I. Antigenic properties of an artificial polyepitopic HIV immunogen. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal* =

Siberian Scientific Medical Journal. 2018; 8 (4): 37–43. [In Russian].

3. Рудометов А.П., Чикаев А.Н., Андреева Н.Б., Щербактова Н.С., Лебедев Л.Р., Каплина О.Н., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Химерный белок HBcAg, несущий миметик эпитопа, узнаваемого моноклональным антителом VRC01. *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*. 2018; 21 (4): 46–51.

Rudometov A.P., Chikaev A.N., Andreeva N.B., Shcherbakova N.S., Lebedev L.R., Kaplina O.N., Il'ichev A.A., Karpenko L.I. Chimeric protein HBcAg carrying the epitope mimetic recognized by the monoclonal antibody VRC01. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2018; 21 (4): 46–51. [In Russian].

4. Arora U., Tyagi P., Swaminathan S., Khanna N. Chimeric Hepatitis B core antigen virus-like particles displaying the envelope domain III of dengue virus type 2. *J. Nanobiotechnol.* 2012; 10 (30): 1–6.

5. Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. HIV-1 genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV type 1 genetic variant spreading in Siberia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014; 30 (6): 592–597.

6. Burton D.R., Mascola J.R. Antibody responses to envelope glycoproteins in HIV-1 infection. *Nat. Immunol.* 2015; 16 (6): 571–576.

7. Frietze K.M., Peabody D.S., Chackerian B. Engineering virus-like particles as vaccine platforms. *Curr. Opin. Virol.* 2016; 18: 44–49.

8. Grgacic E.V.L., Anderson D.A. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods*. 2006; 40 (1): 60–65.

9. Haynes B.F., Burton D.R. Developing an HIV vaccine. *Science*. 2017; 355 (6330): 1129–1130.

10. Jegerlehner A., Tissot A., Lechner F. A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. *Vaccine*. 2002; 20 (25–26): 3104–3112.

11. Jennings G.T., Bachmann M.F. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol. Chem.* 2008; 389 (5): 521–536.

12. Karpenko L.I., Ivanisenko V.A., Pika I.A. Insertion of foreign epitopes in HBcAg: how to make the chimeric particle assemble. *Amino Acids*. 2000; 18 (4): 329–337.

13. Korber B., Hraber P., Wagh K., Hahn B.H. Polyvalent vaccine approaches to combat HIV-1 diversity. *Immunol. Rev.* 2017; 275 (1): 230–244.

14. Manolova V., Flace A., Bauer M., Schwarz K., Saudan P., Bachmann M.F. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur. J. Immunol.* 2008; 38 (5): 1404–1413.

15. McCoy L.E., Burton D.R. Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV. *Immunol. Rev.* 2017; 275 (1): 11–20.

16. Medina-Ramírez M., Garces F., Escolano A., Skog P., de Taeye S.W., Del Moral-Sanchez I., McGuire A.T., Yasmeen A., Behrens A.J., Ozorowski G. Design and crystal structure of a native-like HIV-1 envelope trimer that engages multiple broadly neutralizing antibody precursors *in vivo*. *J. Exp. Med.* 2017; 214 (9): 2573–2590.

17. Montero M., van Houten N.E., Wang X., Scott J.K. The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008; 72: 54–84.

18. Muñoz-Barroso I., Salzwedel K., Hunter E., Blumenthal R. Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *J. Virol.* 1999; 73 (7): 6089–6092.

19. Pumpens P., Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology*. 2001; 44: 98–114.

20. Pumpens P., Grens E. The true story and advantages of the famous Hepatitis B virus core particles: Outlook 2016. *Mol. Biol.* 2016; 50: 489–509.

21. Sahay B., Nguyen C.Q., Yamamoto J.K. Conserved HIV epitopes for an effective HIV vaccine. *J. Clin. Cell. Immunol.* 2017; 8 (4): 1–27.

22. Shcherbakova N.S., Shalamova L.A., Delgado E., Fernández-García A., Vega Y., Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Sokolov Y.V., Shcherbakov D.N., Pérez-Álvarez L., Thomson M.M. Molecular epidemiology, phylogeny, and phylodynamics of CRF63_02A1, a recently originated HIV-1 circulating recombinant form spreading in Siberia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014; 30 (9): 912–919.

23. Whitacre D.C., Lee B.O., Milich D.R. Use of hepatitis B virus core proteins as vaccine platforms. *Expert Rev. Vaccines*. 2009; 8 (11): 1565–1573.

24. Zabel F., Kündig T.M., Bachmann M.F. Virus-induced humoral immunity: on how B cell responses are initiated. *Curr. Opin. Virol.* 2013; 3 (3): 357–362.

Сведения об авторах:

Рудометов А.П., e-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru

Рудометова Н.Б., e-mail: andreeva_nb@vector.nsc.ru

Зайцев Б.Н., к.ф.-м.н., e-mail: zaitsev@vector.nsc.ru

Лебедев Л.Р., д.м.н., e-mail: lebedev_lr@vector.nsc.ru

Ильичев А.А., д.б.н., e-mail: ilyichev@vector.nsc.ru

Карпенко Л.И., д.б.н., e-mail: karpenko@vector.nsc.ru

Information about authors:

Rudometov A.P., e-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru

Rudometova N.B., e-mail: andreeva_nb@vector.nsc.ru

Zaitsev B.N., candidate of physical mathematical sciences, e-mail: zaitsev@vector.nsc.ru

Lebedev L.R., doctor of medical sciences, e-mail: lebedev_lr@vector.nsc.ru

Ilyichev A.A., doctor of biological sciences, e-mail: ilyichev@vector.nsc.ru

Karpenko L.I., doctor of biological sciences, e-mail: karpenko@vector.nsc.ru