

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Применение фагового дисплея для поиска ВИЧ-1-нейтрализующих антител

А.Н. Чикаев¹✉, А.П. Рудометов², Ю.А. Меркульева², Л.И. Карпенко²

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

✉ chikaev@mcb.nsc.ru

Аннотация. Комбинаторная белковая инженерия – востребованный инструмент для решения задач, связанных со скринингом большого разнообразия взаимодействующих молекул: разработки лекарств, средств диагностики, идентификации антител, поиска конформационных имитаторов антигенных детерминант для создания иммуногенов или компонентов вакцин. Среди всех подобных методик одна из наиболее популярных – технология фагового дисплея, появившаяся во второй половине 1980-х гг., однако в силу относительной простоты и универсальности по-прежнему активно применяющаяся для изучения белок-белковых, пептид-белковых и ДНК-белковых взаимодействий. Фаговый дисплей позволяет создавать высокопредставительные библиотеки пептидов, белков или их фрагментов, в которых каждая фаговая частица экспонирует на своей поверхности исследуемые пептиды или белки и одновременно несет в своем геноме последовательность ДНК, кодирующую экспонируемый пептид/белок. Процедура аффинной селекции позволяет находить специфические фаговые клоны практически к любой мишени, а за счет наличия физической связи между генотипом и фенотипом можно эффективно определить структуру отобранных молекул. Значительную роль технология фагового дисплея сыграла в исследованиях, направленных на изучение антигенной структуры вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) и разработку средств борьбы с этим заболеванием. Серьезная проблема, из-за которой до сих пор не удается создать эффективную анти-ВИЧ-вакцину, – сильная антигенная изменчивость вируса. Согласно современным представлениям, для обеспечения защиты от инфицирования необходимо стимулировать индукцию в организме вируснейтрализующих антител, активных в отношении большого числа различных штаммов ВИЧ-1. Соответственно, идентификация подобных антител является важной исследовательской задачей. Тема настоящего обзора – применение фагового дисплея в качестве инструмента для поиска ВИЧ-1-нейтрализующих антител широкого спектра действия. Представлены ключевые характеристики технологии фагового дисплея, кратко описан процесс получения библиотек антител, проведения процедуры аффинной селекции, а также обсуждается феномен ВИЧ-1-нейтрализующих антител широкого спектра действия. Приводится обзор исследований, посвященных поиску кросс-нейтрализующих антител с использованием различных типов фаговых библиотек.

Ключевые слова: фаговый дисплей; библиотеки антител; ВИЧ-1; нейтрализующие антитела широкого спектра действия (bnAbs).

Для цитирования: Чикаев А.Н., Рудометов А.П., Меркульева Ю.А., Карпенко Л.И. Применение фагового дисплея для поиска ВИЧ-1-нейтрализующих антител. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(5):562-572. DOI 10.18699/VJ21.063

Phage display as a tool for identifying HIV-1 broadly neutralizing antibodies

A.N. Chikaev¹✉, A.P. Rudometov², Yu.A. Merkulyeva², L.I. Karpenko²

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

✉ chikaev@mcb.nsc.ru

Abstract. Combinatorial biology methods offer a good solution for targeting interactions of specific molecules by a high-throughput screening and are widely used for drug development, diagnostics, identification of novel monoclonal antibodies, search for linear peptide mimetics of discontinuous epitopes for the development of immunogens or vaccine components. Among all currently available techniques, phage display remains one of the most popular approaches. Despite being a fairly old method, phage display is still widely used for studying protein-protein, peptide-protein and DNA-protein interactions due to its relative simplicity and versatility. Phage display allows highly representative libraries of peptides, proteins or their fragments to be created. Each phage particle in a library displays peptides or proteins fused to its coat protein and simultaneously carries the DNA sequence encoding the displayed peptide/protein in its genome. The biopanning procedure allows isolation of specific clones for almost any target, and due to the physical link between the genotype and the phenotype of recombinant phage particles it is possible

to determine the structure of selected molecules. Phage display technology continues to play an important role in HIV research. A major obstacle to the development of an effective HIV vaccine is an extensive genetic and antigenic variability of the virus. According to recent data, in order to provide protection against HIV infection, the so-called broadly neutralizing antibodies that are cross-reactive against multiple viral strains of HIV must be induced, which makes the identification of such antibodies a key area of HIV vaccinology. In this review, we discuss the use of phage display as a tool for identification of HIV-specific antibodies with broad neutralizing activity. We provide an outline of phage display technology, briefly describe the design of antibody phage libraries and the affinity selection procedure, and discuss the biology of HIV-1-specific broadly neutralizing antibodies. Finally, we summarize the studies aimed at identification of broadly neutralizing antibodies using various types of phage libraries.

Key words: phage display; antibody libraries; HIV-1; broadly neutralizing antibodies (bnAbs).

For citation: Chikaev A.N., Rudometov A.P., Merkulyeva Yu.A., Karpenko L.I. Phage display as a tool for identifying HIV-1 broadly neutralizing antibodies. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(5):562-572. DOI 10.18699/VJ21.063

Введение

Метод фагового дисплея был предложен в 1985 г. Дж. Смитом и Г. Уинтером, за открытие которого спустя 33 года они были удостоены Нобелевской премии по химии. Ученые продемонстрировали способность фаговых частиц экспонировать чужеродные белки в составе собственных поверхностных белков посредством интеграции в одноцепочечную ДНК бактериофага гена целевого полипептида, помещенного в одну рамку считывания, с геном фагового белка оболочки (Smith, 1985). Следует отметить, что концептуально аналогичное исследование было независимо проведено отечественной научной группой под руководством А.А. Ильичева, осуществившей встройку пептид-кодирующей последовательности в область гена белка рVIII фага М13 (Ilyichev et al., 1992; Minenkova et al., 1993). Помимо этого, Дж. Смит и его коллеги предложили способ селекции химерных фаговых клонов, специфично связывающихся с целевым лигандом, за счет аффинного обогащения (Smith, 1985). При этом наличие физической связи между генотипом фаговой частицы и фенотипом экспонируемого на ее поверхности химерного белка оболочки позволяло легко определить последовательности ДНК, кодирующие отобранные молекулы.

Впоследствии были созданы комбинаторные библиотеки бактериофагов, представляющие собой набор огромного числа фаговых частиц, каждая из которых экспонирует на своей поверхности уникальный белок или пептид. Среди них наибольшую популярность приобрели фаговые библиотеки фрагментов иммуноглобулинов: одноцепочечных (scFv) и антигенсвязывающих (Fab) фрагментов молекул IgG (McCafferty et al., 1990; Winter et al., 1994). Существуют также альтернативные форматы фаговых библиотек, основанных на переменных доменах антител из тяжелых цепей камелид (VHH, или наноантитела) и акул (vNAR) (Davies, Riechmann, 1995; Greenberg et al., 1995).

Для представления на поверхности фаговых частиц фрагментов антител кодирующие их последовательности объединяют с геном минорного белка оболочки фага рIII, в результате чего образуются рекомбинантные формы рIII, слитые на N-конце с целевыми молекулами. В отличие от основного оболочечного белка рVIII и других поверхностных белков фага, используемых при создании пептидных библиотек, рIII позволяет включать пептидные последовательности значительно большей длины без потери функциональной активности фаговой частицы (Kay

et al., 1993; Kishchenko et al., 1994; Mullen et al., 2006; Tikunova, Morozova, 2009). В ранних системах дисплея гены фрагментов антител встраивали непосредственно в фаговый геном (McCafferty et al., 1990; Scott, Smith, 1990). В настоящее время ген рекомбинантного рIII, объединенного с ДНК целевых белков, клонируют в составе отдельного плазмидного вектора – фагмиды. Фагмидной ДНК трансформируют клетки *Escherichia coli*, одновременно заражая их фагом-помощником, который несет гены белка оболочки дикого типа, а также все остальные гены, необходимые для инфекции, репликации, сборки и отпочкования фаговых частиц (Ledsgaard et al., 2018). Наличие в фагмиде сайта начала репликации нитчатого бактериофага позволяет ей упаковываться в образующиеся фаговые частицы в форме одноцепочечной ДНК. Таким образом, при добавлении фага-помощника к культуре клеток *E. coli*, трансформированных фагмидой, получаемое фаговое потомство будет содержать как рекомбинантные формы рIII, так и оболочечные белки дикого типа от фага-помощника, и инфекционность не будет нарушена (Felici et al., 1991).

В качестве источника генетического разнообразия антител для создания библиотек чаще всего используют В-клетки иммунизированных животных или реконвалесцентных доноров. Получаемые таким образом иммунные библиотеки содержат фаговые частицы, экспонирующие антиген-специфичные антитела, и включают 10^7 – 10^8 уникальных клонов (Kennedy et al., 2018). В некоторых случаях с целью повышения разнообразия репертуара антител целесообразно использовать «наивные» библиотеки, полученные на основе мРНК лимфоцитов невакцинированных/здоровых доноров, либо интактных животных, а также «синтетические», созданные с использованием *de novo* синтезированных олигонуклеотидов (Griffiths, Duncan, 1998; Tikunova, Morozova, 2009). Представительность подобных библиотек может достигать 10^9 – 10^{10} в случае «наивных» библиотек и до 10^{10} – 10^{11} – «синтетических» (Zhao et al., 2016; Kennedy et al., 2018; Muyldermans, 2021).

Получение фаговых иммунных библиотек антител

Подготовка библиотек начинается с выделения РНК из гибридом, селезенки иммунного животного или В-клеток крови человека и последующего синтеза кДНК (Clackson et al., 1991). Далее с использованием изотип-специфичных праймеров получают набор ПЦР-копий генов переменных

ных участков легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов (или только тяжелых в случае VHH) и клонируют их в составе фагидного вектора в одной рамке считывания с геном рН, располагая после сигнальной последовательности, которая в норме направляет экспорт белка в периплазму. Полученными конструкциями трансформируют клетки *E. coli*, одновременно заражая их фагом-помощником. Образующиеся фаговые частицы содержат фагидную ДНК и несут на своей поверхности кодируемые этими фагидами фрагменты антител с различными комбинациями генов вариабельных цепей (Skerra, Pluckthun, 1988; Tikunova, Morozova, 2009; Hammers, Stanley, 2014).

Далее проводят так называемый биоэннинг – процедуру селекции бактериофагов, экспонирующих антиген-специфические варианты фрагментов антител. Для этого библиотеку инкубируют с молекулой-мишенью, иммобилизованной на иммунологическом планшете, магнитных частицах или иммуносорбенте, после чего производят отмывку несвязавшихся частиц и элюируют фракцию, обогащенную специфичными к мишени фагами. Известны различные способы элюции: с помощью буфера с кислым или щелочным рН либо вытеснением за счет добавления конкурирующего агента (белка или пептида), имеющего сходство с мишенью (Smith, Petrenko, 1997). Еще один часто применяемый и, вероятно, наиболее эффективный способ биоэннинга предполагает проведение аффинной селекции с использованием меченных SS-биотином молекул-мишеней (Chames, Baty, 2010). Мишень при этом наносят на покрытую стрептавидином подложку, после чего проводят стандартную процедуру сорбции фаговой библиотеки и отмывки. SS-биотин содержит дисульфидный мостик, расплывающийся под действием сульфидрильных реагентов, что позволяет отделять комплекс мишень–специфичный бактериофаг от подложки добавлением восстанавливающего агента (дитиотрейтол или 2-меркаптоэтанол). Получаемый таким образом элюат не содержит фаговых клонов, неспецифически связавшихся с подложкой, за счет чего специфичность селекции многократно возрастает.

По завершении каждого раунда биоэннинга элюированными частицами заражают клетки *E. coli* и амплифицируют с помощью фага-помощника, получаемое фаговое потомство задействуют для проведения следующего раунда аффинной селекции. Как правило, для обогащения библиотеки высокоаффинными клонами достаточно одного-двух раундов, однако при привлечении более представительных, но менее специфичных синтетических библиотек число раундов увеличивают до трех-пяти.

Степень обогащения оценивают по количеству антиген-специфичных фаговых клонов, содержащихся в амплифицированных элюатах. Для этого ими заражают клетки *E. coli* и высевают на селективной агаризованной среде. Из полученных отдельных бактериальных колоний выделяют фагидную ДНК, трансфицируют бактериальные клетки, одновременно заражая фагом-помощником, подращивают и получают фаговое потомство. Специфичность каждого клона определяют с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) или иммуноблоттинга, в некоторых случаях используют проточную цитофлуориметрию. Из бактериофагов, обладающих максимальным аффинитетом

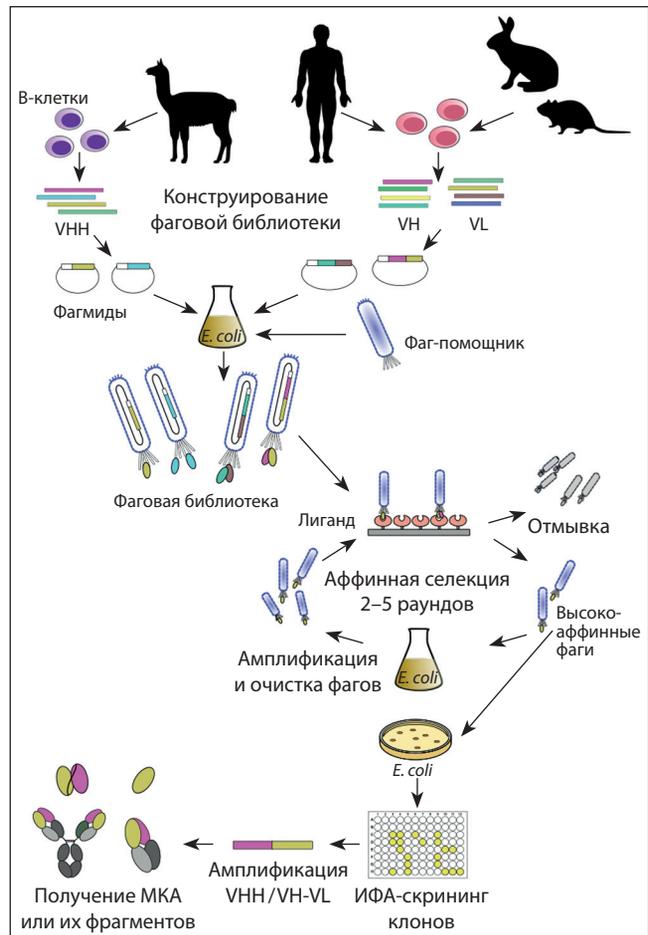


Рис. 1. Схема получения фаговых библиотек антител и процедура аффинной селекции.

к молекулам-мишеням, выделяют ДНК, посредством ПЦР получают последовательности, кодирующие VHH-, Fab- или ScFv-фрагменты, и клонируют в экспрессионных системах для получения соответствующих молекул в растворимой форме, а не в составе фаговых частиц. При необходимости на основе полученных Fab/ScFv можно создать полноразмерные моноклональные антитела (МКА), «сшивая» полученные вариабельные участки генов с последовательностями, кодирующими константные области иммуноглобулинов.

Финальный этап проверки предполагает проведение различных тестов полученных МКА или их фрагментов для оценки их аффинности и avidности по отношению к целевому антигену (Alfaleh et al., 2020). Общая схема метода представлена на рис. 1.

В зависимости от того, требуется ли большее разнообразие клонов или большая специфичность связывания с антигеном, можно варьировать число раундов аффинной селекции. Кроме того, с использованием фаговых библиотек антител можно проводить селекцию против двух антигенов, что позволяет выявлять биспецифические антитела (Hammers, Stanley, 2014).

Сферы применения технологии фагового дисплея очень разнообразны: ее используют в качестве инструмента для разработки противобактериальных терапевтических

средств (Christensen et al., 2001; Huang et al., 2012; Ashby et al., 2017), поиска МКА для терапии онкологических, дерматологических, аутоиммунных заболеваний (Chan et al., 2014; Hammers, Stanley, 2014; Nixon et al., 2014; Alfaleh et al., 2020), разработки биосенсоров (Moon et al., 2019; Sozhamannan, Hofmann, 2020), в качестве платформы адресной доставки лекарств и вакцинных препаратов (Clark, March, 2004; Petrenko, Jayanna, 2014; Немудрая и др., 2016), средства диагностики и терапии вирусных инфекций (Castel et al., 2011; Hess, Jewell, 2020). Широкое применение фаговый дисплей получил и при исследовании вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1). С его помощью осуществляют картирование фрагментов антигенов ВИЧ-1, узнаваемых нейтрализующими антителами, поиск нейтрализующих антител широкого спектра действия, а также получение пептидных имитаторов антигенных детерминант ВИЧ-1 для привлечения в качестве компонентов вакцин, диагностических средств и ингибиторов слияния.

Далее будут представлены примеры использования фагового дисплея для поиска нейтрализующих антител широкого спектра действия.

Нейтрализующие антитела широкого спектра действия

Одной из ключевых особенностей вируса иммунодефицита человека является его феноменальная способность ускользать от действия гуморального иммунного ответа. Для ВИЧ характерен очень высокий уровень спонтанных мутаций, связанный, в первую очередь, с низкой точностью обратной транскриптации: по некоторым данным, вирус иммунодефицита человека – лидирующий по уровню мутагенеза патоген (Cuevas et al., 2015). Мутации приводят к нарушению структуры иммунодоминантных участков ВИЧ-1, в результате большая часть формирующихся в ответ на ВИЧ-инфекцию антител оказывается штамм-специфичными и либо изначально не обладает нейтрализующей активностью, либо мутировавший после нескольких циклов репликации вирус ускользает от их действия. В связи с этим было широко распространено мнение, что в организме человека в принципе не могут появляться ВИЧ-1-нейтрализующие антитела либо происходит это крайне редко (McSoy, Burton, 2017). Тем не менее впоследствии такие антитела все же были обнаружены у так называемых «нон-прогрессоров» – ВИЧ-инфицированных пациентов, у которых в отсутствие антиретровирусной терапии не развивается состояние иммунодефицита. Их сыворотки были способны нейтрализовать не только «собственный» вирус, но и панель, включающую перечень различных изолятов ВИЧ-1 (Dhillon et al., 2007; Walker et al., 2010; Sok, Burton, 2018; Dashti et al., 2019).

Изначально предполагалось, что именно такие антитела, обладающие нейтрализующей активностью в отношении широкого спектра изолятов ВИЧ-1 (broadly neutralizing antibodies, bnAbs), обеспечивают ВИЧ-долготельем способность контролировать уровень вирусной нагрузки (Montefiori et al., 1996). В дальнейшем было показано, что bnAbs вырабатываются у 20–50 % всех ВИЧ-1-инфицированных, но образуются они очень долго: формирование зрелых форм подобных антител может

длиться несколько лет с момента заражения (Doria-Rose et al., 2009; Hraber et al., 2014; Rusert et al., 2016). Эксперименты по пассивной иммунизации макак-резусов показали, что инъекции отдельных bnAbs или их комбинаций обеспечивали животным полную защиту от заражения рекомбинантной формой ВИЧ, инфекционной для обезьян (SHIV) (Hessell et al., 2009; Moldt et al., 2012; Shingai et al., 2014). Кроме того, при введении широконейтрализующих антител ВИЧ-инфицированным людям у них наблюдалось долгосрочное снижение вирусной нагрузки до недетектируемого уровня (Lynch et al., 2015; Scheid et al., 2016), а в ряде случаев формировался собственный протективный гуморальный иммунный ответ (Schoofs et al., 2016).

В настоящее время большинство исследователей сходятся во мнении, что обеспечить защиту от вируса иммунодефицита человека способен иммуноген, индуцирующий наработку вируснейтрализующих антител широкого спектра действия. Таким образом, поиск bnAbs, а также разработка индуцирующих их иммуногенов входят в число наиболее приоритетных задач современной вакцинологии.

Применение фагового дисплея для поиска ВИЧ-1-нейтрализующих антител широкого спектра действия

Первые работы по идентификации bnAbs с помощью фагового дисплея появились в начале 90-х годов прошлого столетия. На то время никаких данных об антителах с широкой нейтрализующей активностью практически не существовало, однако уже была получена детальная информация об антигенной структуре ВИЧ-1 и сформировано четкое понимание того, что для обеспечения эффективной защиты от вируса необходимо гуморальный иммунный ответ нацеливать на участки вирусных белков, слабо подверженных мутагенезу и потому являющихся консервативными среди всего многообразия штаммов (Kowalski et al., 1987; Habeshaw et al., 1990; Putney, 1992). Поэтому эти фрагменты стали основными мишенями для поиска нейтрализующих антител. Впоследствии были обнаружены и другие антигенные детерминанты ВИЧ-1, критичные для проникновения вируса в клетки, также называемые сайтами уязвимости (Shcherbakov et al., 2015; Kwong, Mascola, 2018). На сегодняшний день идентифицировано не менее семи сайтов уязвимости, расположенных в различных участках белка Env (рис. 2).

bnAbs, узнающие консервативные участки гликопротеина gp120

Первым ВИЧ-1-нейтрализующим антителом широкого спектра действия, полученным с помощью фагового дисплея (а также вообще одним из первых охарактеризованных bnAbs), стало IgG1b12. В 1991 г. D.R. Burton с коллегами получили иммунную Fab-библиотеку бактериофагов на основе В-клеток костного мозга ВИЧ-инфицированного нон-прогрессора (Barbas et al., 1991; Burton et al., 1991). После проведения аффинной селекции полученной библиотеки против гликопротеина gp120 ВИЧ-1 штамма ПТВ им удалось отобрать фаговые клоны, с высокой специфичностью связывающиеся с gp120. В результате были идентифицированы специфичные комбинации VH и VL,

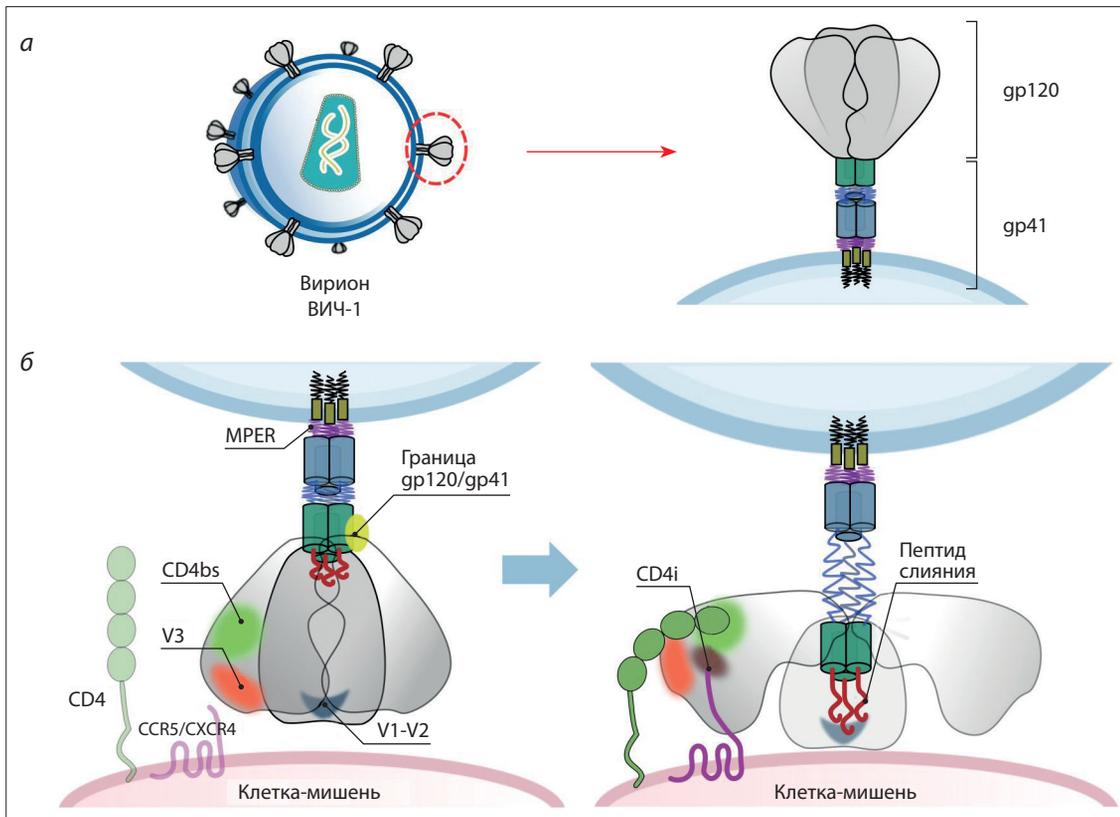


Рис. 2. Участки уязвимости ВИЧ-1, узнаваемые bnAbs.

a – схематичное строение поверхностного гликопротеина (Env) ВИЧ-1. Слева – общий вид вириона, справа – зрелая форма Env, заякоренная на поверхности вирусной частицы. Env представляет собой тример, состоящий из гетеродимерных комплексов молекул gp41 (трансмембранная субъединица) и gp120 (поверхностная субъединица); *б* – конформационные изменения тримеров Env ВИЧ-1, происходящие в процессе инфицирования вирусом клетки-мишени. Указаны ключевые участки уязвимости, являющиеся мишенями для нейтрализующих антител широкого спектра действия: участок связывания CD4 (CD4bs), переменные петли (V1/V2, V3); участок связывания CCR5/CXCR4, образующийся после взаимодействия с CD4 (CD4i); пограничный участок gp120/gp41; мембранно-проксимальный внешний участок gp41 (MPER); расположенный на N-конце gp41 пептид слияния, с помощью которого вирус заякоривается в мембране клетки-хозяина.

объединенные в Fab-формате. Было показано, что эти Fab способны конкурировать с растворимой молекулой CD4 за связывание с gp120 в ИФА (Burton et al., 1991). В своей следующей работе эти исследователи показали нейтрализующую активность отобранных Fab в отношении штамма ВИЧ-1 ШВ. Более того, эти Fab также оказались способны нейтрализовать вирусы штаммов MN и RF (Barbas et al., 1992).

Расширенный скрининг полученной фаговой библиотеки и более детальный анализ позволили выявить клон, экспонирующий Fab-фрагмент под номером b12, который с высокой аффинностью связывался со зрелой формой gp120 в области CD4bs (Roben et al., 1994). Позже на основе Fab b12 было получено рекомбинантное антитело IgG1b12, ставшее одним из первых обнаруженных ВИЧ-1-нейтрализующих антител широкого спектра действия (Burton et al., 1994).

Степень «широты» нейтрализующей активности bnAb b12 неоднократно оценивалась с использованием различных наборов штаммов ВИЧ-1 и панелей первичных изолятов вируса. По разным данным, b12 способен нейтрализовать 30–63 % псевдовирюсов/первичных изолятов (при концентрации IC₅₀ < 50 мкг/мл), причем наи-

большую активность данное МКА проявляет в отношении ВИЧ-1 субтипа В (Burton et al., 1994; Walker et al., 2009; Corti et al., 2010; Wu et al., 2010; Zhang et al., 2012; Gach et al., 2013). До появления bnAbs второго поколения, полученных при помощи сортировки аффинных В-клеток памяти (Sok, Burton, 2018), среди всех обнаруженных на тот момент кросс-нейтрализующих антител IgG1b12 было одним из лидеров по числу нейтрализуемых изолятов ВИЧ-1.

bnAbs, специфичные к участку связывания вируса с рецептором CD4

В рамках работ М.У. Zhang с коллегами были получены два CD4bs-специфичных антитела со сравнительно широкой нейтрализующей активностью. Для этого были созданы фаговые иммунные библиотеки (в Fab-формате) на основе В-клеток из костного мозга трех нон-прогрессоров, в сыроворотках которых присутствовали кросс-нейтрализующие антитела к ВИЧ-1.

С целью выявления клонов, связывающихся с консервативными антигенными детерминантами вируса, биопэннинг осуществляли с помощью двух антигенов. В первом раунде селекции отбор выполняли против рекомби-

нантного гликопротеина gp140_{89,6}, представляющего собой молекулу gp160 ВИЧ-1 штамма 89.6 с удаленными трансмембранным и цитоплазматическим доменами, в комплексе с растворимым CD4 (sCD4). Во втором раунде для этой цели использовали комплекс, состоящий из gp140 на основе ВИЧ-1 штамма ПИВ и молекулы sCD4. Последующие раунды селекции проводили против отдельных молекул gp140_{89,6} и gp140ПИВ соответственно с постепенным снижением концентрации антигена на каждом следующем раунде.

Аффинность связывания отобранных клонов оценивали в ИФА против обоих вариантов gp140 как в комплексе с sCD4, так и отдельно. Обнаружен наиболее аффинный клон m18, способный нейтрализовать 11 из 15 Env-псевдовирюсов на основе различных изолятов ВИЧ-1 (Zhang et al., 2003). Спустя год был осуществлен повторный скрининг отобранных клонов в ИФА с использованием дополнительного антигена JR-FLgp120. Это позволило выявить Fab m14, обладающий возросшей аффинностью и шириотой нейтрализации по сравнению с m18 (Zhang et al., 2004a). Позднее были получены данные по широте нейтрализации на более обширной панели изолятов, согласно которым m14 и m18 нейтрализуют порядка 21–23 % и 13–21 % панели из 30 изолятов соответственно, уступая по данному параметру bnAb IgG1b12 (Zhang et al., 2012).

Применяя аналогичный подход, та же исследовательская группа в дальнейшем провела скрининг фаговой Fab-библиотеки, полученной на основе клеток донора R2 с высокой концентрацией кросс-нейтрализующих антител в сыворотке. В результате селекции были обнаружены Fab-фрагменты CD4bs-специфичных антител m22 и m24, имеющих сходные с m14 и m18 специфичность и широту кросс-нейтрализующей активности (Zhang et al., 2006).

bnAbs, специфичные к gp120

в участке связывания с корецептором CCR5/CXCR4

М. Moulard с коллегами выполняли скрининг фаговой библиотеки антител в формате Fab (IgG1κ), полученной на основе клеток ВИЧ-позитивного пациента, против комплекса gp120-CD4-CCR5 (Moulard et al., 2002). После пяти раундов аффинной селекции был отобран один Fab-клон X5 с уникальной последовательностью участка CDR3 тяжелой цепи. Показано, что аффинность связывания X5 с комплексами CD4-gp120/CD4-gp140 была существенно выше по сравнению с таковой в отношении одиночных молекул gp120 и gp140 соответственно. Добавление денатурированного CCR5 к комплексу CD4-gp120 также увеличивало аффинность X5, что свидетельствовало о том, что узнаваемый им эпитоп формируется в результате CD4-опосредованного изменения конформации gp120. Полноразмерное МКА X5 частично конкурировало за связывание с gp120 с другими CD4i-специфичными антителами, а также в некоторой степени с bnAb IgG1b12, узнающим эпитоп в области CD4bs. При этом даже в Fab-формате X5 нейтрализовало 11 из 12 первичных изолятов ВИЧ-1, продемонстрировав сравнимую с полноразмерным антителом IgG1b12 аффинность и широту нейтрализации (Moulard et al., 2002).

Впрочем, гипотеза о том, что полноразмерный бивалентный вариант IgG X5 будет обладать еще большей

нейтрализующей активностью, впоследствии не подтвердилась, по всей видимости, из-за стерических ограничений доступность узнаваемого X5 эпитопа сильно ограничена и более крупные молекулы не способны связываться с ним (Labrijn et al., 2003; Choudhry et al., 2006). Оказалось, что одноцепочечный фрагмент данного антитела X5, по сравнению с его Fab- и IgG-вариантами, обладает наибольшей активностью и шириотой нейтрализации (Choudhry et al., 2006).

В дальнейшем был осуществлен неспецифический мутагенез последовательностей, кодирующих scFv фрагмент X5. Аффинную селекцию полученной «мутантной» фаговой суббиблиотеки проводили против олигомерной формы gp140_{89,6} (не гомологичного варианту gp120JR-FL, против которого было отобрано X5) в комплексе с sCD4. Выявлены scFv m6 и m9, способные нейтрализовать 96 и 100 % первичных изолятов из панели, содержащей 33 различных штамма. При этом X5 обладало нейтрализующей активностью лишь в отношении 45 % изолятов этой панели (Zhang et al., 2004b). При оценке шириоты нейтрализации на другой панели из 30 различных штаммов ВИЧ-1 m9 нейтрализовало 76 % первичных изолятов (Zhang et al., 2012).

bnAbs, специфичные к району MPER гликопротеина gp41

Другой мишенью для поиска bnAb с помощью фагового дисплея стал мембранно-проксимальный внешний участок гликопротеина gp41 (MPER), расположенный между трансмембранной частью и С-концевым α-спиральным фрагментом gp41. MPER играет важную роль в слиянии вируса с клеточной-мишенью и является высококонсервативным, благодаря чему рассматривается в качестве одной из наиболее перспективных мишеней для создания противовирусных препаратов (Burton, Hangartner, 2016). Среди первых попыток поиска MPER-специфичных bnAbs с помощью фагового дисплея нужно отметить исследование, проведенное М. Zwick с коллегами (2001). Они получили иммунную фаговую библиотеку в Fab-формате на основе кДНК генов VH/VL В-клеток, выделенных из костного мозга ВИЧ-инфицированного пациента без признаков иммунодефицита, в сыворотке которого были обнаружены высокие титры широконейтрализующих антител.

Выполняли два варианта биопаннинга: в первом случае в качестве антигена использовали пептид MN 2031, содержащий фрагмент MPER, во втором селекцию проводили против цельных вирионов ВИЧ-1 штамма MN. Удалось обнаружить несколько MPER-специфичных клонов, среди которых наибольшей аффинностью и шириотой нейтрализации обладал Fab Z13. Впоследствии с целью выявления варианта антитела Z13 с увеличенной аффинностью М. Zwick с коллегами создали «мутантную» библиотеку фагов, экспонирующих Fab Z13 с внесенными случайными мутациями в область гена LCDR3, и провели скрининг против гликопротеина gp41. Среди отобранных бактериофагов максимальную аффинность к MPER gp41 продемонстрировал клон, экспонирующий Fab фрагмент Z13e1. На его основе была получена полноразмерная молекула IgG Z13e1, обеспечившая более чем 100-кратное увеличение аффинности связывания с MPER

и значительное усиление ВИЧ-1-нейтрализующей активности по сравнению с исходным вариантом IgG Z13: число нейтрализуемых изолятов возросло с 35 до 50 % (Zwick et al., 2001; Nelson et al., 2007).

bnAbs, узнающие пограничный участок gp120/gp41

С помощью фагового дисплея также производили поиск bnAbs, связывающихся с N-концевым доменом gp41 – так называемым пептидом слияния (см. рис. 2), доступ антигенов к которому в результате конформационных изменений открывается на последних стадиях проникновения частиц ВИЧ в клетку.

Одна из таких работ была выполнена коллективом под руководством М. Miller (Miller et al., 2005). Эта научная группа использовала «наивную» фаговую scFv библиотеку (образованную на основе В-клеток, выделенных из крови ВИЧ-негативного донора) с целью поиска человеческих моноклональных антител, специфичных к N-концевому участку gp41 (NHR). Проводили последовательные аффинные селекции: вначале против полимера, имитирующего комплекс бНВ, а затем против молекулы IZN36 – имитатора NHR фрагмента. Были отобраны клоны, способные специфически связываться с обоими антигенами. Экспонированные на их поверхности одноцепочечные фрагменты были экспрессированы в виде растворимых scFv, а также в составе молекул IgG1 и исследованы в тесте вируснейтрализации. В итоге идентифицировано антитело H11-BMV-D5, способное нейтрализовать 9 из 19 протестированных изолятов ВИЧ-1 (Miller et al., 2005).

Поиск bnAbs с использованием фагового дисплея в формате однодоменных антител

Помимо «классического» scFv/Fab фагового дисплея, для поиска bnAbs применяли фаговый дисплей в формате однодоменных антител камелид, или наноантител (см. рис. 1). Преимуществами наноантител являются их стабильность и маленький размер, благодаря чему они способны связываться с антигенными детерминантами ВИЧ-1, доступ молекул IgG к которым ограничен вследствие стерических ограничений. Кроме того, отсутствие в структуре VHH легких цепей облегчает проведение генно-инженерных манипуляций при создании библиотеки.

В одном из первых подобных исследований была разработана фаговая иммунная библиотека VHH фрагментов антител лам, которых предварительно иммунизировали тримеризованным гликопротеином gp140 ВИЧ-1 CN54 субтипа С. Для этого из тотальной РНК лимфоцитов животных получали кДНК, амплифицировали репертуар генов VHH и клонировали в фагмидном векторе, образовав библиотеку бактериофагов, экспонирующих в составе части копий белков рIII ВИЧ-специфические VHH. Селекцию библиотек проводили против рекомбинантных молекул gp120, обогащение выполняли в сторону отбора клонов, связывающихся с областью CD4bs. В результате были отобраны VHH A12, C8 и D7, способные нейтрализовать 24 и 26 из 65 Env-псевдовирюсов, полученных на основе первичных изолятов ВИЧ-1 с низкой, средней и высокой устойчивостью к нейтрализации (tier 1, tier 2 и tier 3) (Forsman et al., 2008). Аналогичным образом была создана фагмидная иммунная библиотека на основе VHH

ламы, иммунизированной гликопротеинами gp140 HIV-1 субтипов А и В/С. Скрининг библиотеки позволил выявить клоны наноантител J3 и 3E3, которые высокоаффинно связывались с CD4bs, при этом нейтрализовали 96 и 95 % Env-псевдовирюсов из панели (Mccoy et al., 2012, 2014; Strokappe et al., 2012).

Позже были получены VHH, нацеленные на другие участки вирусных гликопротеинов: 1F10, связывающийся с участком V3 петли, 1B5, распознающий область связывания корцептора CCR5, а также gp41-специфичные варианты 2H10 и 2E7. Перечисленные наноантитела оказались способны нейтрализовать от 45 до 80 % Env-псевдовирюсов из использовавшихся панелей (Lutje Hulsik et al., 2013; Strokappe et al., 2019). На основе VHH, показавших самую высокую кросс-нейтрализующую активность, были получены бивалентные формы. Аффинность этих биспецифичных вариантов по сравнению с моноспецифичными возросла в среднем в 1400 раз, особенно высокое сродство они проявляли в отношении штаммов ВИЧ-1 субтипа С (Lutje Hulsik et al., 2013; Strokappe et al., 2019).

К. Koch с коллегами (2017) независимо разработали фаговую иммунную библиотеку ВИЧ-специфичных VHH с применением лимфоцитов верблюдов, иммунизированных стабилизированными растворимыми формами gp140 ВИЧ-1 субтипа С (SOSIP gp140). Они идентифицировали несколько CD4bs-специфичных наноантител, лучшие из которых (VHH-9, VHH-28, VHH-A6) были способны нейтрализовать 53, 65 и 77 % панели Env-псевдовирюсов, полученной на основе 21 изолята ВИЧ-1.

Авторы рассмотренных работ подчеркивают, что создание иммунных библиотек наноантител камелид и последующий их скрининг – удобный и эффективный способ поиска высокоаффинных ВИЧ-1-нейтрализующих антител широкого спектра действия. Небольшой размер и стабильность VHH позволяют проводить направленный мутагенез для разработки клонов с улучшенными характеристиками, получать гуманизированные и мультивалентные наноантитела, специфичные к разным участкам вирусных антигенов. Наконец, они вполне могут рассматриваться как более дешевая в производстве альтернатива полноразмерным человеческим МКА для терапии ВИЧ-инфекции (Weiss, Verrips, 2019).

Заключение

Фаговый дисплей сыграл значительную роль в поиске, изучении и картировании антител, нейтрализующих ВИЧ-1. Он стал первой методикой, успешно применявшейся для поиска ВИЧ-1-нейтрализующих антител широкого спектра действия, и положил начало активному развитию этого направления исследований. Возможность получения антител, способных нейтрализовать широкий спектр изолятов ВИЧ-1, вызвала оптимизм исследователей, занимающихся разработкой профилактических и терапевтических средств защиты от вируса. Впоследствии для поиска bnAbs стали применять технологию сортировки аффинных клонов В-клеток памяти с использованием молекул-имитаторов функциональных фрагментов вируса с удаленными вариabельными петлями (Wu et al., 2010) в сочетании с методикой высокопроизводительного анализа нейтрализующей активности селективируемых клонов

(Walker et al., 2009). Все это позволило идентифицировать кросс-реактивные ВИЧ-нейтрализующие антитела нового поколения, способные нейтрализовать более 90 % вирусных изолятов.

Обнаружение антител со столь впечатляющими характеристиками возобновило интерес к использованию bnAbs в качестве средства профилактики ВИЧ-инфекции: с 2010 г. зарегистрировано более 30 клинических испытаний ВИЧ-нейтрализующих антител широкого спектра действия (Mahomed et al., 2021). Среди них 12 препаратов прошли первую фазу исследований, продемонстрировав безопасность применения препаратов bnAbs и их комбинаций, 4 препарата находятся на второй фазе, в ближайшее время ожидается обнародование первых результатов оценки их эффективности (Julg, Barouch, 2019; Karuna, Corey, 2020; Mahomed et al., 2020; Stephenson et al., 2020). Наконец, благодаря накопленным данным об особенностях формирования bnAbs (Mascola, Haynes, 2013; Mouquet, Nussenzweig, 2013), а также прогрессу в получении рекомбинантных фрагментов вирусных антигенов (Jardine et al., 2013; Medina-Ramirez et al., 2017; Stamatos et al., 2017; Duan et al., 2018) были предложены новые стратегии по созданию анти-ВИЧ-вакцин нового поколения, нацеленных на индукцию широконейтрализующих антител (Del Moral-Sanchez, Sliopen, 2019).

Таким образом, на сегодняшний день bnAbs – одни из наиболее важных объектов в области изучения ВИЧ-инфекции. Вполне вероятно, что в обозримом будущем они станут достойной альтернативой существующей антиретровирусной терапии, а в более долгосрочной перспективе можно ожидать и появления профилактических вакцинных препаратов, индуцирующих их выработку.

Список литературы / References

- Немудрая А.А., Рихтер В.А., Кулигина Е.В. Фаговые пептидные библиотеки как источник адресующих лигандов. *Acta Naturae*. 2016;8(1(28)):52-63.
[Nemudraya A.A., Richter V.A., Kuligina E.V. Phage peptide libraries as a source of targeted ligands. *Acta Naturae*. 2016;8(1):48-57. DOI 10.32607/20758251-2016-8-1-48-57.]
- Alfaleh M.A., Alsaab H.O., Mahmoud A.B., Alkayyal A.A., Jones M.L., Mahler S.M., Hashem A.M. Phage display derived monoclonal antibodies: from bench to bedside. *Front. Immunol.* 2020;11:1986. DOI 10.3389/fimmu.2020.01986.
- Ashby M., Petkova A., Gani J., Mikut R., Hilpert K. Use of peptide libraries for identification and optimization of novel antimicrobial peptides. *Curr. Top. Med. Chem.* 2017;17(5):537-553. DOI 10.2174/1568026616666160713125555.
- Barbas C.F., 3rd, Crowe J.E., Jr., Cababa D., Jones T.M., Zebedee S.L., Murphy B.R., Chanock R.M., Burton D.R. Human monoclonal Fab fragments derived from a combinatorial library bind to respiratory syncytial virus F glycoprotein and neutralize infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992;89(21):10164-10168. DOI 10.1073/pnas.89.21.10164.
- Barbas C.F., 3rd, Kang A.S., Lerner R.A., Benkovic S.J. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991;88(18):7978-7982. DOI 10.1073/pnas.88.18.7978.
- Burton D.R., Barbas C.F., 3rd, Persson M.A., Koenig S., Chanock R.M., Lerner R.A. A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991;88(22):10134-10137. DOI 10.1073/pnas.88.22.10134.
- Burton D.R., Hangartner L. Broadly neutralizing antibodies to HIV and their role in vaccine design. *Annu. Rev. Immunol.* 2016;34:635-659. DOI 10.1146/annurev-immunol-041015-055515.
- Burton D.R., Pyati J., Koduri R., Sharp S.J., Thornton G.B., Parren P.W., Sawyer L.S., Hendry R.M., Dunlop N., Nara P.L. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science*. 1994;266(5187):1024-1027. DOI 10.1126/science.7973652.
- Castel G., Chteoui M., Heyd B., Tordo N. Phage display of combinatorial peptide libraries: application to antiviral research. *Molecules*. 2011;16(5):3499-3518. DOI 10.3390/molecules16053499.
- Chames P., Baty D. Phage display and selections on biotinylated antigens. In: Kotermann R., Dübel S. (Eds.). *Antibody Engineering*. Humana Press, 2010;151-164. DOI 10.1007/978-3-642-01144-3_11.
- Chan C.E., Lim A.P., Macary P.A., Hanson B.J. The role of phage display in therapeutic antibody discovery. *Int. Immunol.* 2014;26(12):649-657. DOI 10.1093/intimm/dxu082.
- Choudhry V., Zhang M.Y., Dimitrova D., Prabakaran P., Dimitrov A.S., Fouts T.R., Dimitrov D.S. Antibody-based inhibitors of HIV infection. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2006;6(5):523-531. DOI 10.1517/14712598.6.5.523.
- Christensen D.J., Gottlin E.B., Benson R.E., Hamilton P.T. Phage display for target-based antibacterial drug discovery. *Drug Discov. Today*. 2001;6(14):721-727. DOI 10.1016/s1359-6446(01)01853-0.
- Clackson T., Hoogenboom H.R., Griffiths A.D., Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*. 1991;352(6336):624-628. DOI 10.1038/352624a0.
- Clark J.R., March J.B. Bacteriophage-mediated nucleic acid immunisation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2004;40(1):21-26. DOI 10.1016/S0928-8244(03)00344-4.
- Corti D., Langedijk J.P., Hinz A., Seaman M.S., Vanzetta F., Fernandez-Rodriguez B.M., Silacci C., Pinna D., Jarrossay D., Balla-Jhaghoor-singh S., Willems B., Zekveld M.J., Dreja H., O'sullivan E., Pade C., Orkin C., Jeffs S.A., Montefiori D.C., Davis D., Weissenhorn W., Mcknight A., Heeney J.L., Sallusto F., Sattentau Q.J., Weiss R.A., Lanzavecchia A. Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS One*. 2010;5(1):e8805. DOI 10.1371/journal.pone.0008805.
- Cuevas J.M., Geller R., Garijo R., Lopez-Aldeguer J., Sanjuan R. Extremely high mutation rate of HIV-1 *in vivo*. *PLoS Biol.* 2015;13(9):e1002251. DOI 10.1371/journal.pbio.1002251.
- Dashti A., Devico A.L., Lewis G.K., Sajadi M.M. Broadly neutralizing antibodies against HIV: back to blood. *Trends Mol. Med.* 2019;25(3):228-240. DOI 10.1016/j.molmed.2019.01.007.
- Davies J., Riechmann L. Antibody VH domains as small recognition units. *Biotechnology (NY)*. 1995;13(5):475-479. DOI 10.1038/nbt0595-475.
- Del Moral-Sanchez I., Sliopen K. Strategies for inducing effective neutralizing antibody responses against HIV-1. *Expert Rev. Vaccines*. 2019;18(11):1127-1143. DOI 10.1080/14760584.2019.1690458.
- Dhillon A.K., Donners H., Pantophlet R., Johnson W.E., Decker J.M., Shaw G.M., Lee F.H., Richman D.D., Doms R.W., Vanham G., Burton D.R. Dissecting the neutralizing antibody specificities of broadly neutralizing sera from human immunodeficiency virus type 1-infected donors. *J. Virol.* 2007;81(12):6548-6562. DOI 10.1128/JVI.02749-06.
- Doria-Rose N.A., Klein R.M., Manion M.M., O'dell S., Phogat A., Chakrabarti B., Hallahan C.W., Migueles S.A., Wrammert J., Ahmed R., Nason M., Wyatt R.T., Mascola J.R., Connors M. Frequency and phenotype of human immunodeficiency virus envelope-specific B cells from patients with broadly cross-neutralizing antibodies. *J. Virol.* 2009;83(1):188-199. DOI 10.1128/JVI.01583-08.
- Duan H., Chen X., Boyington J.C., Cheng C., Zhang Y., Jafari A.J., Stephens T., Tsybovsky Y., Kalyuzhnyi O., Zhao P., Menis S., Nason M.C., Normandin E., Mukhamedova M., Dekosky B.J., Wells L., Schief W.R., Tian M., Alt F.W., Kwong P.D., Mascola J.R. Glycan

- masking focuses immune responses to the HIV-1 CD4-binding site and enhances elicitation of VRC01-class precursor antibodies. *Immunity*. 2018;49(2):301-311 e305. DOI 10.1016/j.immuni.2018.07.005.
- Felici F., Castagnoli L., Musacchio A., Jappelli R., Cesareni G. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J. Mol. Biol.* 1991;222(2):301-310. DOI 10.1016/0022-2836(91)90213-p.
- Forsman A., Beirnaert E., Aasa-Chapman M.M., Hoorelbeke B., Hija-zi K., Koh W., Tack V., Szynol A., Kelly C., Mcknight A., Verrips T., De Haard H., Weiss R.A. Llama antibody fragments with cross-subtype human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-neutralizing properties and high affinity for HIV-1 gp120. *J. Virol.* 2008;82(24):12069-12081. DOI 10.1128/JVI.01379-08.
- Gach J.S., Quendler H., Tong T., Narayan K.M., Du S.X., Whalen R.G., Binley J.M., Forthal D.N., Poignard P., Zwick M.B. A human antibody to the CD4 binding site of gp120 capable of highly potent but sporadic cross clade neutralization of primary HIV-1. *PLoS One*. 2013;8(8):e72054. DOI 10.1371/journal.pone.0072054.
- Greenberg A.S., Avila D., Hughes M., Hughes A., McKinney E.C., Flajnik M.F. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*. 1995;374(6518):168-173. DOI 10.1038/374168a0.
- Griffiths A.D., Duncan A.R. Strategies for selection of antibodies by phage display. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1998;9(1):102-108. DOI 10.1016/S0958-1669(98)80092-x.
- Habeshaw J.A., Dalgleish A.G., Bountiff L., Newell A.L., Wilks D., Walker L.C., Manca F. AIDS pathogenesis: HIV envelope and its interaction with cell proteins. *Immunol. Today*. 1990;11(11):418-425. DOI 10.1016/0167-5699(90)90162-3.
- Hammers C.M., Stanley J.R. Antibody phage display: technique and applications. *J. Invest. Dermatol.* 2014;134(2):1-5. DOI 10.1038/jid.2013.521.
- Hess K.L., Jewell C.M. Phage display as a tool for vaccine and immunotherapy development. *Bioeng. Transl. Med.* 2020;5(1):e10142. DOI 10.1002/btm2.10142.
- Hessell A.J., Rakasz E.G., Poignard P., Hangartner L., Landucci G., Forthal D.N., Koff W.C., Watkins D.I., Burton D.R. Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers. *PLoS Pathog.* 2009;5(5):e1000433. DOI 10.1371/journal.ppat.1000433.
- Hraber P., Korber B.T., Lapedes A.S., Bailer R.T., Seaman M.S., Gao H., Greene K.M., Mccutchan F., Williamson C., Kim J.H., Tovanabutra S., Hahn B.H., Swanstrom R., Thomson M.M., Gao F., Harris L., Giorgi E., Hangartner N., Bhattacharya T., Mascola J.R., Montefiori D.C. Impact of clade geography and age of the epidemic on HIV-1 neutralization by antibodies. *J. Virol.* 2014;88(21):12623-12643. DOI 10.1128/JVI.01705-14.
- Huang J.X., Bishop-Hurley S.L., Cooper M.A. Development of anti-infectives using phage display: biological agents against bacteria viruses and parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012;56(9):4569-4582. DOI 10.1128/AAC.00567-12.
- Ilyichev A.A., Minenkova O.O., Kishchenko G.P., Tat'kov S.I., Karpishev N.N., Eroshkin A.M., Ofitzerov V.I., Akimenko Z.A., Petrenko V.A., Sandakhchiev L.S. Inserting foreign peptides into the major coat protein of bacteriophage M13. *FEBS Lett.* 1992;301(3):322-324. DOI 10.1016/0014-5793(92)80267-k.
- Jardine J., Julien J.P., Menis S., Ota T., Kalyuzhnyi O., McGuire A., Sok D., Huang P.S., Macpherson S., Jones M., Nieuwsma T., Mathison J., Baker D., Ward A.B., Burton D.R., Stamatatos L., Nemazee D., Wilson I.A., Schief W.R. Rational HIV immunogen design to target specific germline B cell receptors. *Science*. 2013;340(6133):711-716. DOI 10.1126/science.1234150.
- Julg B., Barouch D.H. Neutralizing antibodies for HIV-1 prevention. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2019;14(4):318-324. DOI 10.1097/COH.0000000000000556.
- Karuna S.T., Corey L. Broadly neutralizing antibodies for HIV prevention. *Annu. Rev. Med.* 2020;71(1):329-346. DOI 10.1146/annurev-med-110118-045506.
- Kay B.K., Adey N.B., He Y.S., Manfredi J.P., Mataragnon A.H., Fowlkes D.M. An M13 phage library displaying random 38-amino-acid peptides as a source of novel sequences with affinity to selected targets. *Gene*. 1993;128(1):59-65. DOI 10.1016/0378-1119(93)90153-t.
- Kennedy P.J., Oliveira C., Granja P.L., Sarmento B. Monoclonal antibodies: technologies for early discovery and engineering. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2018;38(3):394-408. DOI 10.1080/07388551.2017.1357002.
- Kishchenko G., Batliwala H., Makowski L. Structure of a foreign peptide displayed on the surface of bacteriophage M13. *J. Mol. Biol.* 1994;241(2):208-213. DOI 10.1006/jmbi.1994.1489.
- Koch K., Kalusche S., Torres J.L., Stanfield R.L., Danquah W., Khanzandari K., Von Briesen H., Geertsma E.R., Wilson I.A., Wernery U., Koch-Nolte F., Ward A.B., Dietrich U. Selection of nanobodies with broad neutralizing potential against primary HIV-1 strains using soluble subtype C gp140 envelope trimers. *Sci. Rep.* 2017;7(1):8390. DOI 10.1038/s41598-017-08273-7.
- Kowalski M., Potz J., Basiripour L., Dorfman T., Goh W.C., Terwilliger E., Dayton A., Rosen C., Haseltine W., Sodroski J. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science*. 1987;237(4820):1351-1355. DOI 10.1126/science.3629244.
- Kwong P.D., Mascola J.R. HIV-1 vaccines based on antibody identification B cell ontogeny and epitope structure. *Immunity*. 2018;48(5):855-871. DOI 10.1016/j.immuni.2018.04.029.
- Labrijn A.F., Poignard P., Raja A., Zwick M.B., Delgado K., Franti M., Binley J., Vivona V., Grundner C., Huang C.C., Venturi M., Petropoulos C.J., Wrin T., Dimitrov D.S., Robinson J., Kwong P.D., Wyatt R.T., Sodroski J., Burton D.R. Access of antibody molecules to the conserved coreceptor binding site on glycoprotein gp120 is sterically restricted on primary human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 2003;77(19):10557-10565. DOI 10.1128/jvi.77.19.10557-10565.2003.
- Ledsgaard L., Kilstrup M., Karatt-Vellatt A., McCafferty J., Laustsen A.H. Basics of antibody phage display technology. *Toxins (Basel)*. 2018;10(6). DOI 10.3390/toxins10060236.
- Lutje Hulsik D., Liu Y.Y., Strokappe N.M., Battella S., El Khattabi M., Mccoy L.E., Sabin C., Hinz A., Hock M., Macheboeuf P., Bonvin A.M., Langedijk J.P., Davis D., Forsman Quigley A., Aasa-Chapman M.M., Seaman M.S., Ramos A., Poignard P., Favier A., Simorre J.P., Weiss R.A., Verrips C.T., Weissenhorn W., Rutten L. A gp41 MPER-specific llama VHH requires a hydrophobic CDR3 for neutralization but not for antigen recognition. *PLoS Pathog.* 2013;9(3):e1003202. DOI 10.1371/journal.ppat.1003202.
- Lynch R.M., Boritz E., Coates E.E., Dezure A., Madden P., Costner P., Enama M.E., Plummer S., Holman L., Hendel C.S., Gordon I., Casazza J., Conan-Cibotti M., Migueles S.A., Tressler R., Bailer R.T., Mcdermott A., Narpala S., O'dell S., Wolf G., Lifson J.D., Freemire B.A., Gorelick R.J., Pandey J.P., Mohan S., Chomont N., Fromentin R., Chun T.W., Fauci A.S., Schwartz R.M., Koup R.A., Douek D.C., Hu Z., Capparelli E., Graham B.S., Mascola J.R., Ledgerwood J.E., VRC 601 Study Team. Virologic effects of broadly neutralizing antibody VRC01 administration during chronic HIV-1 infection. *Sci. Transl. Med.* 2015;7(319):319ra206. DOI 10.1126/scitranslmed.aad5752.
- Mahomed S., Garrett N., Baxter C., Abdool Karim Q., Abdool Karim S.S. Clinical trials of broadly neutralizing monoclonal antibodies for Human Immunodeficiency Virus prevention: a review. *J. Infect. Dis.* 2021;223(3):370-380. DOI 10.1093/infdis/jiaa377.
- Mahomed S., Garrett N., Karim Q.A., Zuma N.Y., Capparelli E., Baxter C., Gengiah T., Archary D., Samsunder N., Rose N.D., Moore P., Williamson C., Barouch D.H., Fast P.E., Pozzetto B., Hankins C., Carlton K., Ledgerwood J., Morris L., Mascola J., Abdool Karim S. Assessing the safety and pharmacokinetics of the anti-HIV mono-

- clonal antibody CAP256V2LS alone and in combination with VRC07-523LS and PGT121 in South African women: study protocol for the first-in-human CAPRISA 012B phase I clinical trial. *BMJ Open*. 2020;10(11):e042247. DOI 10.1136/bmjopen-2020-042247.
- Mascola J.R., Haynes B.F. HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's pathways. *Immunol. Rev.* 2013;254(1):225-244. DOI 10.1111/imr.12075.
- McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. 1990;348(6301):552-554. DOI 10.1038/348552a0.
- McCoy L.E., Burton D.R. Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV. *Immunol. Rev.* 2017;275(1):11-20. DOI 10.1111/imr.12484.
- McCoy L.E., Quigley A.F., Strokappe N.M., Bulmer-Thomas B., Seaman M.S., Mortier D., Rutten L., Chander N., Edwards C.J., Kettler R., Davis D., Verrips T., Weiss R.A. Potent and broad neutralization of HIV-1 by a llama antibody elicited by immunization. *J. Exp. Med.* 2012;209(6):1091-1103. DOI 10.1084/jem.20112655.
- McCoy L.E., Rutten L., Frampton D., Anderson I., Granger L., Bashford-Rogers R., Dekkers G., Strokappe N.M., Seaman M.S., Koh W., Grippo V., Kliche A., Verrips T., Kellam P., Fassati A., Weiss R.A. Molecular evolution of broadly neutralizing llama antibodies to the CD4-binding site of HIV-1. *PLoS Pathog.* 2014;10(12):e1004552. DOI 10.1371/journal.ppat.1004552.
- Medina-Ramirez 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., Van Den Kerkhof T., Freund N.T., Dosenovic P., Hua Y., Gitlin A.D., Cupo A., Van Der Woude P., Golabek M., Slieden K., Blane T., Kootstra N., Van Breemen M.J., Pritchard L.K., Stanfield R.L., Crispin M., Ward A.B., Stamatatos L., Klasse P.J., Moore J.P., Nemazee D., Nussenzweig M.C., Wilson I.A., Sanders R.W. 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. DOI 10.1084/jem.20161160.
- Miller M.D., Gelezianus R., Bianchi E., Lennard S., Hrin R., Zhang H., Lu M., An Z., Ingallinella P., Finotto M., Mattu M., Finnefrock A.C., Bramhill D., Cook J., Eckert D.M., Hampton R., Patel M., Jantow S., Joyce J., Ciliberto G., Cortese R., Lu P., Strohl W., Schleif W., Mcelhaugh M., Lane S., Lloyd C., Lowe D., Osbourn J., Vaughan T., Emini E., Barbato G., Kim P.S., Hazuda D.J., Shiver J.W., Pessi A. A human monoclonal antibody neutralizes diverse HIV-1 isolates by binding a critical gp41 epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102(41):14759-14764. DOI 10.1073/pnas.0506927102.
- Minenkova O.O., Ilyichev A.A., Kishchenko G.P., Petrenko V.A. Design of specific immunogens using filamentous phage as the carrier. *Gene*. 1993;128(1):85-88. DOI 10.1016/0378-1119(93)90157-x.
- Moldt B., Rakasz E.G., Schultz N., Chan-Hui P.Y., Swiderek K., Weisgrau K.L., Piaskowski S.M., Bergman Z., Watkins D.I., Poignard P., Burton D.R. Highly potent HIV-specific antibody neutralization *in vitro* translates into effective protection against mucosal SHIV challenge *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109(46):18921-18925. DOI 10.1073/pnas.1214785109.
- Montefiori D.C., Baba T.W., Li A., Bilaska M., Ruprecht R.M. Neutralizing and infection-enhancing antibody responses do not correlate with the differential pathogenicity of SIVmac239delta3 in adult and infant rhesus monkeys. *J. Immunol.* 1996;157(12):5528-5535.
- Moon J.S., Choi E.J., Jeong N.N., Sohn J.R., Han D.W., Oh J.W. Research progress of M13 bacteriophage-based biosensors. *Nanomaterials (Basel)*. 2019;9(10). DOI 10.3390/nano9101448.
- Moulard M., Phogat S.K., Shu Y., Labrijn A.F., Xiao X., Binley J.M., Zhang M.Y., Sidorov I.A., Broder C.C., Robinson J., Parren P.W., Burton D.R., Dimitrov D.S. Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002;99(10):6913-6918. DOI 10.1073/pnas.102562599.
- Mouquet H., Nussenzweig M.C. HIV: Roadmaps to a vaccine. *Nature*. 2013;496(7446):441-442. DOI 10.1038/nature12091.
- Mullen L.M., Nair S.P., Ward J.M., Rycroft A.N., Henderson B. Phage display in the study of infectious diseases. *Trends Microbiol.* 2006; 14(3):141-147. DOI 10.1016/j.tim.2006.01.006.
- Muyldermans S. A guide to: generation and design of nanobodies. *FEBS J.* 2021;288(7):2084-2102. DOI 10.1111/febs.15515.
- Nelson J.D., Brunel F.M., Jensen R., Crooks E.T., Cardoso R.M., Wang M., Hessel A., Wilson I.A., Binley J.M., Dawson P.E., Burton D.R., Zwick M.B. An affinity-enhanced neutralizing antibody against the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 gp41 recognizes an epitope between those of 2F5 and 4E10. *J. Virol.* 2007;81(8):4033-4043. DOI 10.1128/JVI.02588-06.
- Nixon A.E., Sexton D.J., Ladner R.C. Drugs derived from phage display: from candidate identification to clinical practice. *MAbs*. 2014; 6(1):73-85. DOI 10.4161/mabs.27240.
- Petrenko V.A., Jayanna P.K. Phage protein-targeted cancer nanomedicines. *FEBS Lett.* 2014;588(2):341-349. DOI 10.1016/j.febslet.2013.11.011.
- Putney S. How antibodies block HIV infection: paths to an AIDS vaccine. *Trends Biochem. Sci.* 1992;17(5):191-196. DOI 10.1016/0968-0004(92)90265-b.
- Roben P., Moore J.P., Thali M., Sodroski J., Barbas C.F., 3rd, Burton D.R. Recognition properties of a panel of human recombinant Fab fragments to the CD4 binding site of gp120 that show differing abilities to neutralize human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 1994;68(8):4821-4828. DOI 10.1128/JVI.68.8.4821-4828.1994.
- Rusert P., Kouyos R.D., Kadelka C., Ebner H., Schanz M., Huber M., Braun D.L., Hoze N., Scherrer A., Magnus C., Weber J., Uhr T., Cippa V., Thorball C.W., Kuster H., Cavassini M., Bernasconi E., Hoffmann M., Calmy A., Battegay M., Rauch A., Yerly S., Aubert V., Klimkait T., Boni J., Fellay J., Regoes R.R., Gunthard H.F., Trkola A., Swiss Hives T. Determinants of HIV-1 broadly neutralizing antibody induction. *Nat. Med.* 2016;22(11):1260-1267. DOI 10.1038/nm.4187.
- Scheid J.F., Horwitz J.A., Bar-On Y., Kreider E.F., Lu C.L., Lorenzi J.C., Feldmann A., Braunschweig M., Nogueira L., Oliveira T., Shmeliovich I., Patel R., Burke L., Cohen Y.Z., Hadrihan S., Settler A., Witmer-Pack M., West A.P., Jr., Juelg B., Keler T., Hawthorne T., Zingman B., Gulick R.M., Pfeifer N., Learn G.H., Seaman M.S., Bjorkman P.J., Klein F., Schlesinger S.J., Walker B.D., Hahn B.H., Nussenzweig M.C., Caskey M. HIV-1 antibody 3BNC117 suppresses viral rebound in humans during treatment interruption. *Nature*. 2016;535(7613):556-560. DOI 10.1038/nature18929.
- Schoofs T., Klein F., Braunschweig M., Kreider E.F., Feldmann A., Nogueira L., Oliveira T., Lorenzi J.C., Parrish E.H., Learn G.H., West A.P., Jr., Bjorkman P.J., Schlesinger S.J., Seaman M.S., Czaratoski J., Mcelrath M.J., Pfeifer N., Hahn B.H., Caskey M., Nussenzweig M.C. HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. *Science*. 2016; 352(6288):997-1001. DOI 10.1126/science.aaf0972.
- Scott J.K., Smith G.P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*. 1990;249(4967):386-390. DOI 10.1126/science.1696028.
- Shcherbakov D.N., Bakulina A.Y., Karpenko L.I., Ilyichev A.A. Broadly neutralizing antibodies against HIV-1 as a novel aspect of the immune response. *Acta Naturae*. 2015;7(4):11-21.
- Shingai M., Donau O.K., Plishka R.J., Buckler-White A., Mascola J.R., Nabel G.J., Nason M.C., Montefiori D., Moldt B., Poignard P., Diskin R., Bjorkman P.J., Eckhaus M.A., Klein F., Mouquet H., Cetrulo Lorenzi J.C., Gazumyan A., Burton D.R., Nussenzweig M.C., Martin M.A., Nishimura Y. Passive transfer of modest titers of potent and broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibodies block SHIV infection in macaques. *J. Exp. Med.* 2014;211(10):2061-2074. DOI 10.1084/jem.20132494.

- Skerra A., Pluckthun A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*. 1988;240(4855):1038-1041. DOI 10.1126/science.3285470.
- Smith G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985; 228(4705):1315-1317. DOI 10.1126/science.4001944.
- Smith G.P., Petrenko V.A. Phage display. *Chem. Rev.* 1997;97(2):391-410. DOI 10.1021/cr960065d.
- Sok D., Burton D.R. Recent progress in broadly neutralizing antibodies to HIV. *Nat. Immunol.* 2018;19(11):1179-1188. DOI 10.1038/s41590-018-0235-7.
- Sozhamannan S., Hofmann E.R. The state of the art in biodefense related bacterial pathogen detection using bacteriophages: how it started and how it's going. *Viruses*. 2020;12(12). DOI 10.3390/v12121393.
- Stamatatos L., Pancera M., McGuire A.T. Germline-targeting immunogens. *Immunol. Rev.* 2017;275(1):203-216. DOI 10.1111/imr.12483.
- Stephenson K.E., Wagh K., Korber B., Barouch D.H. Vaccines and broadly neutralizing antibodies for HIV-1 prevention. *Annu. Rev. Immunol.* 2020;38(673-703). DOI 10.1146/annurev-immunol-080219-023629.
- Strokappe N.M., Hock M., Rutten L., McCoy L.E., Back J.W., Cailat C., Haffke M., Weiss R.A., Weissenhorn W., Verrips T. Super potent bispecific llama VHH antibodies neutralize HIV via a combination of gp41 and gp120 epitopes. *Antibodies (Basel)*. 2019;8(2). DOI 10.3390/antib8020038.
- Strokappe N., Szynol A., Aasa-Chapman M., Gorlani A., Forsman Quigley A., Hulsik D.L., Chen L., Weiss R., De Haard H., Verrips T. Llama antibody fragments recognizing various epitopes of the CD-4bs neutralize a broad range of HIV-1 subtypes A, B and C. *PLoS One*. 2012;7(3):e33298. DOI 10.1371/journal.pone.0033298.
- Tikunova N.V., Morozova V.V. Phage display on the base of filamentous bacteriophages: application for recombinant antibodies selection. *Acta Naturae*. 2009;1(3):20-28.
- Walker L.M., Phogat S.K., Chan-Hui P.Y., Wagner D., Phung P., Goss J.L., Wrin T., Simek M.D., Fling S., Mitcham J.L., Lehman J.K., Priddy F.H., Olsen O.A., Frey S.M., Hammond P.W., Investigators P.G.P., Kaminsky S., Zamb T., Moyle M., Koff W.C., Poignard P., Burton D.R. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science*. 2009;326(5950):285-289. DOI 10.1126/science.1178746.
- Walker L.M., Simek M.D., Priddy F., Gach J.S., Wagner D., Zwick M.B., Phogat S.K., Poignard P., Burton D.R. A limited number of antibody specificities mediate broad and potent serum neutralization in selected HIV-1 infected individuals. *PLoS Pathog.* 2010;6(8):e1001028. DOI 10.1371/journal.ppat.1001028.
- Weiss R.A., Verrips C.T. Nanobodies that neutralize HIV. *Vaccines (Basel)*. 2019;7(3). DOI 10.3390/vaccines7030077.
- Winter G., Griffiths A.D., Hawkins R.E., Hoogenboom H.R. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* 1994;12(433-455). DOI 10.1146/annurev.12.040194.002245.
- Wu X., Yang Z.Y., Li Y., Hogerkorp C.M., Schief W.R., Seaman M.S., Zhou T., Schmidt S.D., Wu L., Xu L., Longo N.S., Mckee K., O'dell S., Louder M.K., Wycuff D.L., Feng Y., Nason M., Doria-Rose N., Connors M., Kwong P.D., Roederer M., Wyatt R.T., Nabel G.J., Mascola J.R. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science*. 2010; 329(5993):856-861. DOI 10.1126/science.1187659.
- Zhang M.Y., Choudhry V., Sidorov I.A., Tenev V., Vu B.K., Choudhary A., Lu H., Stiegler G.M., Katinger H.W., Jiang S., Broder C.C., Dimitrov D.S. Selection of a novel gp41-specific HIV-1 neutralizing human antibody by competitive antigen panning. *J. Immunol. Methods*. 2006;317(1-2):21-30. DOI 10.1016/j.jim.2006.09.016.
- Zhang M.Y., Shu Y., Phogat S., Xiao X., Cham F., Bouma P., Choudhary A., Feng Y.R., Sanz I., Rybak S., Broder C.C., Quinnan G.V., Evans T., Dimitrov D.S. Broadly cross-reactive HIV neutralizing human monoclonal antibody Fab selected by sequential antigen panning of a phage display library. *J. Immunol. Methods*. 2003; 283(1-2):17-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2003.07.003>.
- Zhang M.Y., Shu Y., Rudolph D., Prabakaran P., Labrijn A.F., Zwick M.B., Lal R.B., Dimitrov D.S. Improved breadth and potency of an HIV-1-neutralizing human single-chain antibody by random mutagenesis and sequential antigen panning. *J. Mol. Biol.* 2004a; 335(1):209-219. DOI 10.1016/j.jmb.2003.09.055.
- Zhang M.Y., Xiao X., Sidorov I.A., Choudhry V., Cham F., Zhang P.F., Bouma P., Zwick M., Choudhary A., Montefiori D.C., Broder C.C., Burton D.R., Quinnan G.V., Jr., Dimitrov D.S. Identification and characterization of a new cross-reactive human immunodeficiency virus type 1-neutralizing human monoclonal antibody. *J. Virol.* 2004b; 78(17):9233-9242. DOI 10.1128/JVI.78.17.9233-9242.2004.
- Zhang M.Y., Yuan T., Li J., Rosa Borges A., Watkins J.D., Guenaga J., Yang Z., Wang Y., Wilson R., Li Y., Polonis V.R., Pincus S.H., Ruprecht R.M., Dimitrov D.S. Identification and characterization of a broadly cross-reactive HIV-1 human monoclonal antibody that binds to both gp120 and gp41. *PLoS One*. 2012;7(9):e44241. DOI 10.1371/journal.pone.0044241.
- Zhao A., Tohidkia M.R., Siegel D.L., Coukos G., Omid Y. Phage antibody display libraries: a powerful antibody discovery platform for immunotherapy. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2016;36(2):276-289. DOI 10.3109/07388551.2014.958978.
- Zwick M.B., Bonnycastle L.L., Menendez A., Irving M.B., Barbas C.F., 3rd, Parren P.W., Burton D.R., Scott J.K. Identification and characterization of a peptide that specifically binds the human broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody b12. *J. Virol.* 2001;75(14):6692-6699. DOI 10.1128/JVI.75.14.6692-6699.2001.

ORCID ID

A.N. Chikaev orcid.org/0000-0001-5423-3457
A.P. Rudometov orcid.org/0000-0003-2808-4309
Yu.A. Merkuleva orcid.org/0000-0002-6974-0686
L.I. Karpenko orcid.org/0000-0003-4365-8809

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00879.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 12.01.2021. После доработки 14.03.2021. Принята к публикации 22.03.2021.