

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия
человека

Федеральное бюджетное учреждение науки
**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»**

На правах рукописи

Чикаев Антон Николаевич

**Пептиды-имитаторы эпитопов ВИЧ-1, узнаваемых
нейтрализующими антителами широкого спектра действия**

03.01.03 – «молекулярная биология»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
проф. Ильичев А.А.

Кольцово 2015

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	5
Введение	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. ВИЧ-инфекция	12
1.2. Вакцины против ВИЧ-1/СПИД	16
1.2.1. Проблемы, возникающие на пути создания эффективного средства против ВИЧ-инфекции	16
1.2.2. Стратегии создания вакцины против ВИЧ-1	17
1.3. Нейтрализующие антитела широкого спектра действия	20
1.3.1. Первое поколение нейтрализующих ВИЧ-1 антител широкого спектра действия	21
1.3.2. Второе поколение нейтрализующих ВИЧ-1 антител широкого спектра действия	22
1.4. Подходы к решению задачи создания эффективного иммуногена, обеспечивающего индукцию антител широкого спектра действия	28
1.5. Метод фагового дисплея	35
1.5.1. Фаговые пептидные библиотеки	36
1.5.2. Возможности технологии фагового дисплея	38
1.5.3. Применение технологии фагового дисплея при изучении ВИЧ-1	40
1.5.3.1. Изучение антигенной структуры белков ВИЧ-1	40
1.5.3.2. Исследование нейтрализующих ВИЧ-1 антител широкого спектра действия	41
1.5.3.3. Исследование поликлональных антител, направленных против вирусных эпитопов	45
Заключение к литературному обзору	49
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	50
2.1. Материалы	50
2.1.1. Реактивы	50

2.1.2. Пептиды, бактериальные штаммы, моноклональные антитела	51
2.1.3. Культуральные среды	51
2.1.4. Магнитные частицы	51
2.1.5. Фаговые пептидные библиотеки	51
2.1.6. Плазмиды, несущие гены ВИЧ-1	52
2.1.7. Растворы	52
2.2. Методы	53
2.2.1. Аффинная селекция	53
2.2.2. Выявление последовательностей рандомизированных вставок, экспонированных на фагах, неспецифично связывающихся с полистирольными планшетами	54
2.2.3. Титрование фагов с использованием клеток E. coli ER2738	55
2.2.4. Выделение и наработка индивидуальных фаговых клонов	55
2.2.5. Выделение фаговой ДНК	55
2.2.6. Дот блот анализ	56
2.2.7. Вестерн-блот анализ	56
2.2.8. Компьютерный анализ	57
2.2.9. Получение антисывороток к бактериофагам	57
2.2.10. Получение Env-псевдотипированных вирусов	58
2.2.11. Определение цитопатической дозы 50 % псевдовирюсов	58
2.2.12. Реакция вируснейтрализации	59
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	61
3.1. Поиск пептидов-имитаторов эпитопа ВИЧ-1, узнаваемого нейтрализующим моноклональным антителом Z13e1	61
3.1.1. Аффинная селекция фаговых библиотек с моноклональным антителом Z13e1 и анализ отобранных фаговых клонов	61
3.1.2. Анализ аминокислотных последовательностей отобранных пептидов	62
3.1.3. Дот блот анализ отобранных фаговых клонов	65

3.1.4. Иммуногенные свойства отобранных пептидов в составе бактериофагов	67
3.2. Результаты аффинной селекции и анализ фаговых клонов, селектированных с использованием моноклонального антитела IgG1b12	72
3.2.1. Аффинная селекция фаговых библиотек с моноклональным антителом IgG1b12 и анализ отобранных фаговых клонов	72
3.2.2. Характеристика антигенных свойств отобранных клонов	74
3.2.3. Анализ аминокислотных последовательностей пептидов, взаимодействующих с моноклональным антителом IgG1b12	77
3.2.4. Оценка способности отобранных фаготопов конкурировать с вирусным антигеном за связывание с моноклональным антителом IgG1b12	78
3.2.5. Проверка нейтрализующей активности сывороток животных, иммунизированных бактериофагами	81
3.3. Результаты аффинной селекции и анализ фаговых клонов, селектированных с использованием моноклональных антител VRC01	82
3.3.1. Аффинная селекция фаговых библиотек с моноклональным антителом VRC01 и анализ отобранных фаговых клонов	82
3.3.2. Характеристика антигенных свойств отобранных бактериофагов	84
3.3.3. Компьютерный анализ аминокислотных последовательностей пептидов, взаимодействующих с моноклональным антителом VRC01	86
3.3.4. Оценка способности отобранных фаготопов конкурировать с МКА VRC01 за связывание с узнаваемым им эпитопом	89
3.3.5. Модель взаимодействия комплекса VRC01-gp120 и пептидов, входящих в состав селектированных бактериофагов	92
3.3.6. Проверка нейтрализующей активности сывороток животных, иммунизированных препаратами бактериофагов	94
Заключение	99
Выводы	100
Список литературы	101

Список сокращений

BCIP – 5-бром-4-хлор-3-индолил-фосфат

bNAbs (broadly neutralizing antibodies) – нейтрализующие ВИЧ-1 антитела широкого спектра действия

CD4-BS (CD4-binding site) – область gp120 ВИЧ-1 в районе связывания с CD4 лимфоцитами

CD4i – поверхность фрагмента gp120 в районе CD4bs, которая в результате конформационных изменений, происходящих после связывания ВИЧ-1 с рецептором CD4, становится доступна для взаимодействия с некоторыми нейтрализующими антителами

MPER (membrane-proximal external region) – мембранно-проксимальный внешний район gp41 ВИЧ-1

NBT – нитротетразолиевый синий

PAAG – полиакриламидный гель

PBS (phosphate-buffered solution) – фосфатно-солевой буферный раствор

SDS – додецил сульфат натрия

SHIV (simian-human immunodeficiency virus) – вирус иммунодефицита обезьяны-

TCID₅₀ – доза заражения 50 % культуры ткани

а.о. – аминокислотный остаток

АРТ – антиретровирусная терапия

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВИО – вирус иммунодефицита обезьян

ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека 1 типа

ИФА – иммуноферментный анализ

МКА – моноклональные антитела

н.д. – нет данных

п.о. – пары оснований

СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита человека

ЦТЛ – цитотоксические Т- лимфоциты человека

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. ВИЧ-1 является одним из самых хорошо изученных вирусов, однако до сих пор не удается найти эффективное средство лечения и профилактики данного заболевания. С начала эпидемии СПИДа более 70 миллионов человек заразились ВИЧ-1, около половины из них уже нет в живых [10]. Заметного прогресса удалось добиться лишь в области разработки методов антиретровирусной терапии (АРТ), позволяющих значительно продлевать жизнь ВИЧ-инфицированных. Тем не менее, они по-прежнему остаются паллиативным средством борьбы с вирусом и неспособны остановить пандемию ВИЧ-1. Кроме того, высокая стоимость АРТ является существенным фактором, ограничивающим ее повсеместное использование.

К настоящему времени признано, что единственно возможным и реальным способом предотвратить распространение ВИЧ-инфекции и СПИД является создание профилактической вакцины. Однако исследования в данной области сопряжены с принципиальными затруднениями: раннее формирование латентного вирусного резервуара, высокая генетическая и, как следствие, антигенная изменчивость ВИЧ-1 позволяют ему ускользать от защитного действия иммунной системы.

Одним из важнейших направлений исследований по созданию вакцины против ВИЧ-1 является идентификация фрагментов вирусных белков, узнаваемых антителами, которые обладают нейтрализующей активностью в отношении широкого спектра субтипов вируса [123, 164, 174]. Такие антитела, объединяемые термином broadly neutralizing antibodies (bnAbs), были впервые обнаружены у т. н. нон-прогрессоров – ВИЧ-инфицированных пациентов, у которых не проявляются симптомы СПИДа. В силу своих необычных характеристик bnAbs привлекли всеобщее внимание исследователей и послужили мощным стимулом к разработке вакцины против ВИЧ-1 [51]. На сегодняшний день из сывороток ВИЧ-инфицированных выделено несколько десятков нейтрализующих антител широкого спектра действия, созданы их продуценты [17, 73, 98, 166, 180].

Способность bnAbs нейтрализовать очень большое число первичных изолятов ВИЧ-1, в первую очередь, обусловлена тем, что они связываются с консервативными областями поверхностных белков вируса, которые практически не подвержены мутагенезу. Такие участки вирусных гликопротеинов, являющиеся мишенями для

нейтрализующих антител широкого спектра действия, называют сайтами уязвимости (sites of vulnerability). Выделяют 4 основных сайта уязвимости: MPER регион гликопротеина gp41, который играет важную роль в процессе проникновения вируса в клетку-мишень, эпитопы в области V1/V2 и V3 петель, в формировании которых участвуют *N*-связанные гликаны, и сайт связывания вируса с клеточным рецептором CD4 (CD4-BS) гликопротеина gp120 ВИЧ-1 (Env) (рис. 1).

HIV-1 Spike and Its Recognition by Neutralizing Antibodies

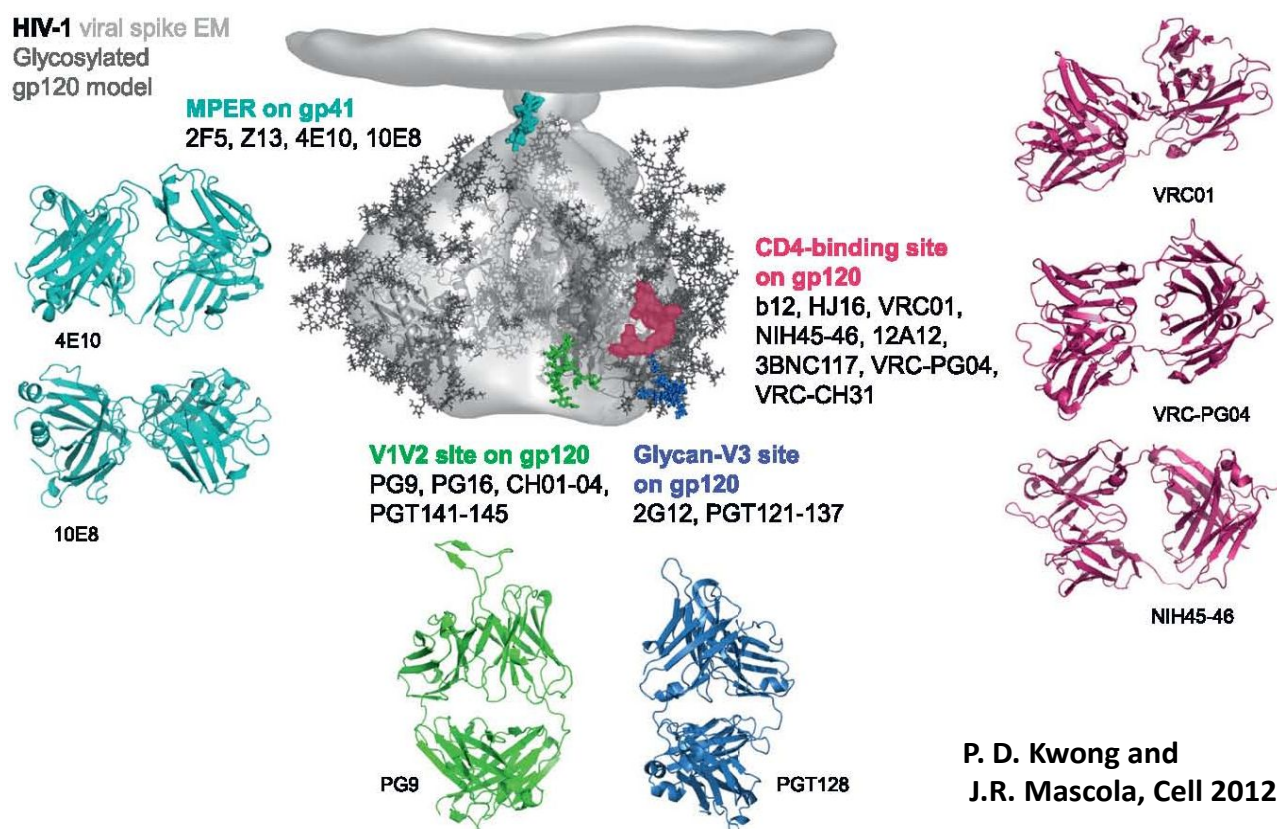


Рис. 1. Схематическое изображение структуры поверхностного шипа ВИЧ-1, построенной на основе результатов криоэлектронной микроскопии. Участки уязвимости, узнаваемые некоторыми нейтрализующими антителами широкого спектра действия, выделены цветом: бирюзовым – MPER регион, зеленым и синим – гликан-зависимые эпитопы в области V1/V2 и V3 петель, бордовым – CD4-BS [89]

Поиск новых нейтрализующих антител широкого спектра действия продолжается и в настоящее время. В частности, в 2014 году появились данные о новых антителах широкого спектра 8ANC185 и семейства PGT151-158. Их эпитопы располагаются в области стыковки gp41 и gp120 и также являются гликан-зависимыми. Данный ранее неизвестный "суперсайт" уязвимости, по мнению исследователей, является очень интересным объектом для изучения и может быть потенциально полезен при создании вакцины [22, 54, 142]. Таким образом, можно

ожидать, что в ближайшем будущем список bnAbs и узнаваемых ими антигенных детерминант будет расширен.

Учитывая уникальные свойства нейтрализующих антител широкого спектра действия, очень перспективной выглядит идея создания вакцин, способных индуцировать их наработку [77, 91, 182]. Одной из существенных проблем в решении этой задачи является сложная пространственная организация антигенных детерминант, узнаваемых большинством нейтрализующих ВИЧ-1 антител. В частности, активные центры использовавшихся в данной работе антител IgG1b12 и VRC01 взаимодействуют с конформационными антигенными детерминантами в области CD4-BS. Это затруднение можно преодолеть, если в качестве иммуногена использовать конструкцию, которая экспонирует эпитопы в виде линейных аминокислотных последовательностей, имитирующих нативные участки поверхностных гликопротеинов ВИЧ-1 [177, 178]. Предполагается, что такая конструкция будет индуцировать в организме образование одного или нескольких нейтрализующих антител, обладающих сходными характеристиками с bnAbs-прототипами. Для поиска линейных пептидов-имитаторов антигенных детерминант могут использоваться методы комбинаторной биологии, в частности, фаговый дисплей, который позволяет проводить скрининг пептидных библиотек бактериофагов для идентификации последовательностей, обладающих требуемыми антигенными свойствами [152]. Фаговые библиотеки содержат пептиды определенной длины и случайного аминокислотного состава, экспонированные на поверхности нитчатого бактериофага в составе одного из белков оболочки. Они сконструированы таким образом, что чужеродный пептид, находясь на N-конце поверхностного белка оболочки бактериофага, располагается на поверхности вириона и доступен для взаимодействия с белком-лигандом (или антителом), использующимся для аффинной селекции [151]. Благодаря огромному разнообразию пептидов в фаговых библиотеках с помощью процедуры биопэнинга можно выявить такие последовательности, которые могли бы имитировать конформацию нативного эпитопа.

Цель данной работы заключалась в получении с помощью техники фагового дисплея пептидов-имитаторов эпитопов, узнаваемых bNAbs Z13e1, IgG1b12 и VRC01, и изучении их антигенных и иммуногенных свойств.

В соответствии с поставленной целью необходимо было решить следующие задачи:

- отобрать из комбинаторных пептидных библиотек клоны бактериофагов, связывающиеся с bNAbs Z13e1, IgG1b12 и VRC01. Определить аминокислотные последовательности пептидов, экспонируемых на поверхности отобранных бактериофагов;
- провести анализ специфичности связывания отобранных фаговых клонов/пептидов с моноклональными антителами Z13e1, IgG1b12 и VRC01 с помощью иммуноблотинга;
- оценить способность селектированных пептидов/фаговых клонов подавлять нейтрализующую активность bNAbs Z13e1, IgG1b12 и VRC01 в реакции вирус-нейтрализации с использованием модели псевдовирусов;
- изучить иммуногенные свойства отобранных фаговых клонов/пептидов и их способность индуцировать нейтрализующие ВИЧ-1 антитела.

Научная новизна и практическая ценность работы. В ходе исследования с помощью аффинной селекции из фаговых библиотек отобраны клоны, несущие пептиды, специфично взаимодействующие с bNAbs Z13e1, IgG1b12 и VRC01. Определены аминокислотные последовательности пептидов, экспонированных в составе отобранных фагов. Обнаружены консенсусные мотивы в аминокислотных последовательностях пептидов, связывающихся с bNAbs VRC01 и Z13e1. Подтверждена специфичность взаимодействия пептидов, выявленных в составе отобранных фагов, с нейтрализующими антителами широкого спектра действия Z13e1, IgG1b12 и VRC01.

Впервые установлено, что отобранные пептиды-имитаторы способны конкурировать с ВИЧ-1 (штамм NL4-3) за связывание с нейтрализующими ВИЧ-1 антителами широкого спектра действия IgG1b12 и VRC01 в реакции вируснейтрализации.

Впервые показано, что пептиды-имитаторы, отобранные по способности связываться с антителом VRC01, имитируют фрагмент петли gp120 в области связывания с CD4-рецептором.

Впервые установлено, что сыворотки кроликов, иммунизированных фагами, которые экспонируют полученные в работе пептиды-миметики эпитопов, узнаваемых антителами Z13e1, IgG1b12 и VRC01, обладают нейтрализующей активностью в отношении псевдотипированных частиц ВИЧ-1.

Полученные в результате работы пептиды-имитаторы могут быть использованы для конструирования искусственных иммуногенов, индуцирующих антитела против широкого спектра изолятов ВИЧ-1. Создание эффективных средств профилактики ВИЧ-инфекции, в частности эффективной вакцины, будет способствовать снижению риска заболеваемости населения СПИДом. Как следствие, это приведет к снижению смертности населения, к уменьшению затрат государства на лечение ВИЧ-инфицированных.

Кроме того, пептиды можно будет использовать для разработки диагностических систем для выявления антител к ВИЧ-1. Результаты работ будут интересны фармацевтическим и биотехнологическим компаниям, занимающимся разработкой лекарственных, вакцинных и диагностических препаратов.

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1) Аффинная селекция фаговых пептидных библиотек позволяет отобрать клоны, специфично взаимодействующие с нейтрализующими ВИЧ-1 антителами широкого спектра действия Z13e1, IgG1b12 и VRC01.
- 2) В аминокислотных последовательностях пептидов, связывающихся с МКА VRC01 и Z13e1, обнаружены консенсусные мотивы.
- 3) Отобранные бактериофаги экспонируют пептиды, которые, по крайней мере, частично имитируют фрагмент петли gp120, связывающейся с CD4-рецептором.
- 4) Отобранные пептиды-имитаторы способны подавлять нейтрализующую активность антител VRC01 в реакции конкурентного ингибирования.
- 5) Иммунизация мышей отобранными против МКА Z13e1 фаготопами вызывает наработку gp41-специфических антител.
- 6) Сыворотки лабораторных животных, иммунизированных пептидами-миметиками в контексте бактериофагов, обладают нейтрализующей активностью в отношении псевдотипированных вирусов, полученных на основе различных штаммов ВИЧ-1.

Личный вклад автора. Все основные эксперименты, включая аффинную селекцию с использованием фаговых пептидных библиотек, выделение и очистку фаговой ДНК, иммуноблотинг, иммунизацию лабораторных животных, оценку способности пептидов-имитаторов подавлять нейтрализующую активность антител VRC01, IgG1b12 в реакции конкурентного ингибирования, выполнены автором лично. Оценка вируснейтрализующей активности сывороток иммунизированных животных с использованием env-псевдотипированных частиц ВИЧ-1 проводилась совместно с Щербаковой Н.С. и Шаламовой Л.А. (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»). Компьютерный анализ, включавший построение моделей пептидов-миметиков, молекулярный докинг и определение соответствия между отобранными последовательностями пептидов и антигеном gp120 путем наложения смоделированных структур пептидов на комплекс VRC01-gp120, был выполнен канд. биол. наук Бакулиной А.Ю., теоретический отдел ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Регрессионный анализ данных по вируснейтрализующей активности антисывороток выполнен совместно с канд. биол. наук Антоном Д.В., теоретический отдел ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В настоящее время ВИЧ-инфекция/СПИД является единственным неизлечимым инфекционным заболеванием с неизбежным смертельным исходом, распространение которого приняло пандемический характер. За последние 30 лет более 70 миллионов человек приобрели статус ВИЧ-инфицированных и 35 миллионов из них погибли. Всего на сегодняшний день около тридцати пяти миллионов человек инфицированы ВИЧ-1, что делает это заболевание одной из наиболее актуальных проблем современного здравоохранения [10].

1.1. ВИЧ-инфекция

Вирус иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) – инфекционный агент, вызывающий Синдром Приобретенного Иммунодефицита человека (СПИД). Геном ВИЧ-1 представлен двумя позитивными копиями РНК размером около 10000 нуклеотидов, кодирующими структурные гены *gag*, *pol* и *env*, а также дополнительные гены *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* и *vpu* (рис. 2) [133].

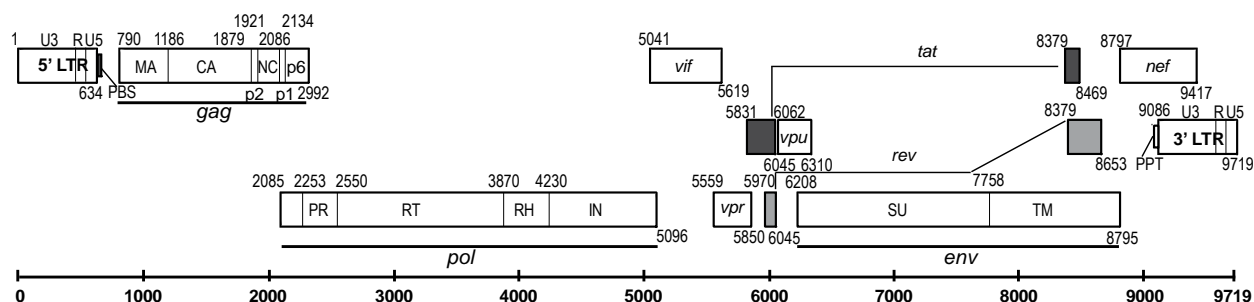


Рис. 2. Схематическое представление генома ВИЧ-1. Геном ВИЧ-1 содержит три структурных гена – *gag*, *pol* и *env*, а также шесть вспомогательных генов (*vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *nef*). Структурные гены кодируют белки матрикса (MA), капсида (CA), нуклеокапсида (NC), р6, р2 и р1 (*gag*); протеазу (PR), обратную транскриптазу (RT), РН полипептид (РН), интегразу (IN) (*pol*); поверхностный (SU, gp120) и трансмембранный (TM, gp41) белки оболочки (*env*). Гены расположены в одном ряду в соответствии с рамкой считывания. На конце генома обозначены длинные концевые повторы – LTR, подразделенные на U3, R и U5 последовательности, а также прилежащие к ним сайт инициации репликации (PBS) и полипуриновый тракт (PPT). Цифры сверху и снизу каждого прямоугольника соответствуют координатам начала и окончания структурной единицы соответственно. Приведенная нумерация соответствует штамму HXB2CG ВИЧ-1 (www.hiv.lanl.gov). В нижней части рисунка расположена линейка, отражающая размер и взаимное расположение генов

Ген *gag* кодирует структурные белки p17 и p24, pol – вирусные ферменты (обратную транскриптазу, интегразу и протеазу), гены *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpr* и *nef* кодируют белки, выполняющие различные функции, которые также имеют огромное значение для жизненного цикла вируса (рис. 2). Ген *env* кодирует гликопротеин gp160, который под действием протеазы клетки-хозяина впоследствии расщепляется на функциональные белки gp120 и gp41, необходимые вирусу для связывания с клеткой хозяина [67]. В свою очередь, поверхностный gp120 и трансмембранный gp41 собираются на поверхности ВИЧ-1 в тримеры, состоящие из трех копий трансмембранного гликопротеина gp41 и нековалентно связанных с ним молекул gp120. Комплексы gp120-gp41 ответственны за проникновение вируса в клетку путем связывания с CD4-рецептором клеток иммунной системы. После связывания с CD4 гликопротеин gp120 претерпевает конформационные изменения, в результате которых обнажается V3-петля – участок, с помощью которого ВИЧ-1 взаимодействует с хемокиновыми корецепторами CCR5 или CXCR4. Затем с помощью N-концевого домена слияния gp41 проникает в клеточную мембрану. После того как gp41 «зацепился» за мембрану клетки-мишени, он приобретает U-образную конформацию, складываясь в виде петли шпильки (hairpin loop). Тем самым он притягивает вирусную мембрану к клеточной, которые затем сливаются. Наконец, вирусный капсид проникает в клетку, и генетический материал выходит в цитоплазму (рис. 3).

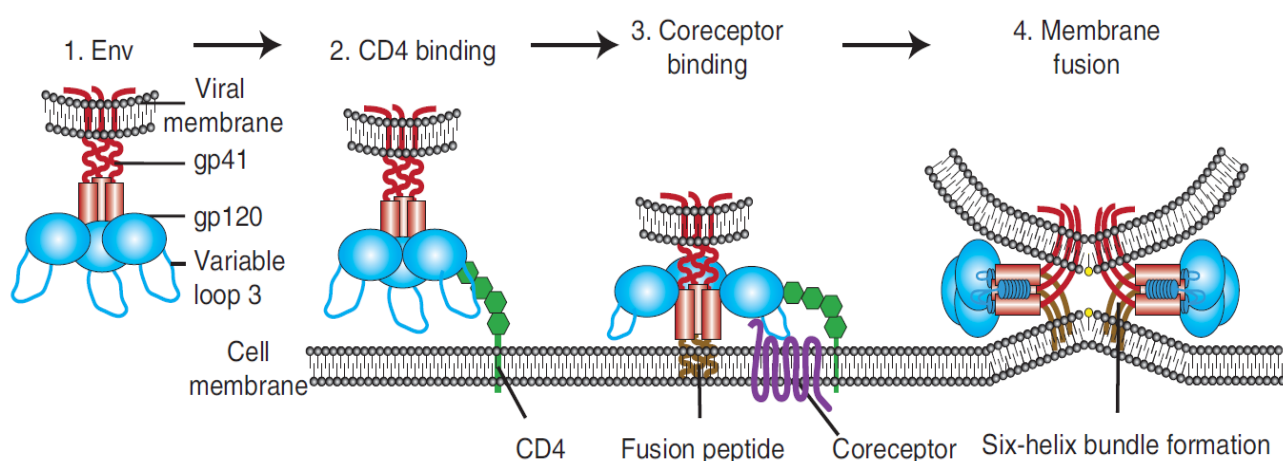


Рис. 3. Модель проникновения ВИЧ-1 в клетку. (1 и 2) Узнавание и связывание гликопротеина gp120 с CD4 рецептором; (3) связывание корецептора CCR5 (или CXCR4) и проникновение пептида слияния, расположенного на N-конце gp41, в мембрану клетки-мишени; (4) Стадия «шпильки» и слияние вирусной и клеточной мембран [149]

Большинство штаммов вируса используют только один из корецепторов клеток хозяина и классифицируются, соответственно, как CCR5- (R5) или CXCR4-тропные (X4) штаммы. Также были описаны вирусы с двойным тропизмом, которые используют для связывания вируса с клеткой любой из перечисленных рецепторов. R5 вирусы заражают макрофаги и CCR5-экспрессирующие Т-лимфоциты. X4 вирусы часто появляются на более поздних стадиях инфекции и заражают CXCR4-экспрессирующие Т-клетки и Т-клеточные линии [92].

После проникновения ВИЧ-1 внутрь клетки начинают функционировать белки, кодируемые генами gag и pol. Обратная транскриптаза преобразует одноцепочечную РНК вируса в двуцепочечную молекулу кДНК, которая затем транспортируется в ядро и с помощью вирусной интегразы встраивается в клеточный геном. Далее за счет комплекса ферментов клетки-хозяина происходит транскрипция и трансляция белков, кодируемых вирусным геномом, и их последующий процессинг под действием протеазы ВИЧ-1. В результате образовавшийся белковый комплекс вместе с вирусной РНК формирует новые вирусные частицы, высвобождаемые в межклеточное пространство или заражающие соседние клетки. При этом вирус в полной мере использует для своих нужд клеточную систему хозяина и инициирует патогенный механизм апоптоза [4].

На начальной стадии заболевания количество вируса быстро возрастает (до 10^6 копий/мл), а количество CD4⁺ клеток снижается примерно вдвое относительно нормы, составляющей 1000 ± 400 клеток/мм³. Благодаря интенсивной вирусной репликации (до 10^{10} вирусных частиц в день) происходит инфицирование новых CD4⁺ клеток и постепенное снижение популяции CD4⁺ лимфоцитов при отсутствии лечения. После фазы острой инфекции количество вируса снижается и достигает определенного стабильного уровня (около 5×10^3 - 10^4 копий/мл). Эта средняя фаза заболевания обычно длится от нескольких месяцев до нескольких лет. Клиническая прогрессия заболевания от момента инфицирования ВИЧ-1 до появления симптомов СПИДа происходит при снижении количества CD4⁺ лимфоцитов до 200 клеток/мм³. На этом этапе вирусная продукция вновь достигает пика, наблюдаемого в острой фазе инфекции, что вследствие ослабления иммунитета хозяина способствует развитию оппортунистических заболеваний. Без терапевтического вмешательства вторичные оппортунистические инфекции чаще всего приводят к смерти больного [6].

Методы борьбы с ВИЧ-инфекцией подразумевают целый комплекс мероприятий, включающий просветительные, социальные и противоэпидемические работы, разработку препаратов для терапии и профилактики, схем их применения, а также исследования, направленные на создание профилактической вакцины. В последние годы достигнуты значительные успехи в разработке новых терапевтических агентов и стратегии лечения ВИЧ-инфекции. Основными мишенями разрабатываемых лекарственных препаратов против ВИЧ-1 служат жизненно важные ферменты вируса: обратная транскриптаза, протеаза и интегразы, а также белки оболочки и рецепторы на поверхности Т-лимфоцитов. В период с 1987 г. по 2008 г. было разрешено применение 18 лекарственных препаратов, представляющих собой нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1, с 1995 по 2006 год – 11 препаратов, ингибирующих протеазу. Из наиболее современных средств АРТ, допущенных к применению (с 2003 по 2007 год), можно отметить два препарата-ингибитора рецепторов CCR5/CCR2, которые блокируют ВИЧ на стадии проникновения в клетку, а также ингибитор вирусной интегразы [6], [48], [156]. В настоящее время в США официально используется около 30 различных терапевтических препаратов. На начальной стадии лечения рекомендуется использовать комбинации одного или двух нуклеозидных аналогов, одного нуклеотидного и/или одного ингибитора протеазы.

В целом антиретровирусная терапия позволяет существенно увеличить продолжительности жизни больным, а также снизить число новых случаев инфицирования. В то же время длительное использование антиретровирусных препаратов приводит к тяжелым побочным эффектам и появлению лекарственно-устойчивых штаммов вируса, что обуславливает необходимость разработки новых средств терапии [158]. Кроме того, несмотря на появление высокоэффективных и относительно безвредных лекарств, позволяющих снизить уровень вирусной нагрузки до неопределяемого (менее 10 копий вирусной РНК на 1 мл плазмы), АРТ не способна полностью освободить организм от ВИЧ. Дополнительным фактором, существенно ограничивающим применение антиретровирусных препаратов, является их высокая цена.

К настоящему времени признано, что единственно возможным и реальным способом предотвратить распространение ВИЧ-инфекции и СПИДа является создание профилактической вакцины [52, 69, 106].

1.2. Вакцины против ВИЧ-1/СПИДа

1.2.1. Проблемы, возникающие на пути создания эффективного средства против ВИЧ-инфекции

ВИЧ-1 радикальным образом отличается от других вирусов, вызывающих инфекционные заболевания, против которых были успешно разработаны вакцины в прошлом. Эти отличия порождают проблемы, с которыми сталкиваются ученые в попытках создать вакцину [64, 69]. Среди наиболее существенных причин, не позволяющих разработать эффективно средство борьбы с ВИЧ, можно выделить следующие:

- крайне высокая изменчивость вируса как на уровне отдельных зараженных индивидов, так и на уровне популяции;
- способность уклоняться от действия нейтрализующих антител. Защиту ВИЧ-1 от гуморального иммунного ответа обеспечивает плотная сетка углеводов, называемая «гликановым щитом», которая покрывает поверхностные гликопротеины, вируса gp120 и gp41. Исследования показали, что наличие «гликанового щита» на gp120 значительно ограничивает связывание нейтрализующих антител с этим комплексом [123]. Кроме того, высокое генетическое разнообразие «уводит» иммунную реакцию в сторону от производства нейтрализующих антител широкого спектра действия [154];
- интеграция генетического материала ВИЧ в человеческий геном, что приводит к пожизненному инфицированию;
- отсутствие в настоящее время идеальной модели инфекции на животных, на которой можно было бы проверить эффективность вакцины против вируса иммунодефицита. Использование для моделирования инфекции человекообразных обезьян очень дорого и, кроме того, патогенез заболевания, вызванного ВИЧ-1 и вирусом иммунодефицита обезьян (ВИО), а также основные антигены гистосовместимости у обезьян и человека отличаются. Исследователям вакцин против ВИЧ-1 приходится полагаться на трансгенные животные модели, но прогностическая ценность таких моделей будет оставаться неопределенной до тех пор, пока не будет продемонстрирована

способность кандидатной вакцины защищать человека от СПИДа в рамках клинических испытаний.

Наконец, серьезной проблемой является отсутствие сведений о том, какой силы должен быть индуцируемый вакциной протективный иммунный ответ. В случае многих других вирусных инфекций зачастую можно выявить лиц, которые инфицируются патогеном, но отвечают на него спонтанной иммунной реакцией и побеждают инфекцию. Исследование переболевших людей позволяет выявить параметры иммунного ответа организма, необходимого и достаточного для борьбы с заболеванием, что облегчает создание вакцины. Для ВИЧ-1 не существует задокументированного случая выздоровления, и параметры протективного иммунного ответа остаются неизвестными. В отсутствие таких сведений у ученых нет четких критериев оценки эффективности различных вакцинных препаратов. Неясно, сколько – одной или более – врожденных, клеточно-опосредованных, мукозальных или гуморальных иммунных реакций необходимо, чтобы обеспечить защитный иммунитет. В частности, мукозальный иммунитет может потребоваться для профилактики ВИЧ-инфекции на самых ранних стадиях [16, 69].

1.2.2. Стратегии создания вакцины против ВИЧ-1

По мере изучения вируса и особенностей его жизненного цикла стратегии создания вакцины несколько раз кардинально менялась. В первые годы после открытия ВИЧ-инфекции предпринимались попытки ее получения с применением традиционных подходов, т.е. в качестве иммуногена использовались аттенуированные или инактивированные формы вируса, либо субъединичные конструкции, объединяющие в одной молекуле несколько фрагментов антигена [57, 129]. Подобная стратегия ранее успешно применялась для профилактики оспы, гриппа, краснухи, кори и других вирусных инфекций, поэтому предполагалось, что для обеспечения надежной защиты от ВИЧ-1 будет достаточно гуморального звена иммунного ответа. К сожалению, достичь успеха на этом пути не удалось: ни один из препаратов, дошедших до 3 фазы клинических испытаний, не продемонстрировал протективного эффекта. К ним относятся рекомбинантные анти-ВИЧ-1 вакцины AIDSVAX B/B и AIDSVAX B/E производства компании VaxGen (Vax003/004), масштабные испытания которых проводились в США/Нидерландах и Таиланде и

завершились в 2003 году. Основу препаратов составляли рекомбинантные гликопротеины gp120, взятые из ВИЧ-1 разных штаммов. [57, 63, 129]. Обе вакцины не обеспечивали статистически значимого снижения частоты инфицирования ВИЧ-1 у вакцинируемых, несмотря на повторявшиеся через 2 года бустерные иммунизации [63].

Таким образом, традиционный подход к созданию вакцины против ВИЧ-1 оказался недостаточно эффективным по причине того, что вирус обладает мощной защитой от нейтрализующего действия антител. Его оболочечный белок Env, являющийся основной мишенью для гуморального иммунитета, имеет на своей поверхности множество N-гликанов, особенно в области консервативных и потенциально уязвимых доменов. Высокая плотность «гликанового щита» делает данные участки невосприимчивыми к действию Т- и В-клеточного ответа. По этой причине они были названы «иммунологически немой поверхностью» (silent face). Кроме того, часть функциональных областей Env скрыто от действия антител за счет гибких вариабельных петель.

Эта неудача, в совокупности с появившимися новыми данными о роли Т-клеточного ответа в защите организма от вируса, послужила стимулом к пересмотру концепции создания анти-ВИЧ-1 вакцины. В результате широкое распространение получила идея о том, что анти-ВИЧ-1 вакцина должна стимулировать наработку вирус-специфических CD8⁺ Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Было создано несколько кандидатных ЦТЛ-иммуногенов, направленных на уничтожение инфицированных вирусом клеток [14, 87, 106, 134, 138]. Смена парадигмы, тем не менее, не привела к положительным результатам. В 2007 году полным провалом окончились клинические испытания Т-клеточной вакцины MRKAd5 (Merck), созданной на основе репликационно-некомпетентного аденовируса 5-го серотипа, экспрессирующего гены белков ВИЧ-1: Gag, Pol, Nef [29]. Промежуточные результаты показали, что она оказалась неспособна предотвратить заражение ВИЧ-1 или снизить вирусную нагрузку после инфицирования. Более того, наличие предшествующих нейтрализующих антител к аденовирусу у вакцинируемых приводило к повышению риска заражения вирусом [147]. В 2013 были досрочно остановлены клинические испытания HVTN 505 (HVTN/NIAID) из-за низкой эффективности испытываемого препарата. По составу он схож с MRKAd5, однако схема введения предполагала использование аденовирусного вектора Ad5 в качестве бустера, а прайм-вакцинация

осуществлялась путем инъекций ДНК, кодирующей гены поверхностных и структурных белков ВИЧ. Соответственно, он также должен был стимулировать индукцию CD8⁺ и CD4⁺ клеток.

В итоге был скорректирован взгляд на роль гуморального ответа в защите от ВИЧ-инфекции и сделано заключение о том, что вакцина должна индуцировать протективные антитела, действие которых должно быть направлено, прежде всего, на белки оболочки вируса [106].

В 2009 были опубликованы результаты клинических испытаний вакцины RV144, которая включала в свой состав иммуногены, предназначенные для стимуляции как В-, так и Т-клеточного звена иммунитета. В качестве праймирующего антигена в ней был использован рекомбинантный вирус оспы канареек, экспрессирующий гены *env*, *gag* и протеазы ВИЧ-1 (ALVAC-HIV vCP1521), а для бустерной вакцинации применялся препарат AIDSVAX B/E (Vax003) на основе гликопротеина gp120 ВИЧ-1. Данная вакцина обеспечивала уровень защиты от инфицирования вирусом, достигающий 31,2 %. По сравнению с предыдущими неудачными экспериментами данную работу можно считать первой относительно успешной попыткой создания вакцины, однако ее эффективность по-прежнему слишком низкая и недостаточная для того, чтобы обеспечить надежную защиту от ВИЧ-инфекции. Следует отметить, что в первый год испытаний вакцина обеспечивала защиту на уровне 60 %, после чего концентрация ВИЧ-специфических антител в крови иммунизированных падала, и ее эффективность снижалась. Дальнейшие исследования показали, что причина невысоких показателей защиты от ВИЧ, по-видимому, связана с бустерирующим компонентом AIDSVAX, ответственным за индукцию гуморального ответа. Выяснилось, что антитела, образующиеся в ответ на введение вакцины, либо не способны нейтрализовать вирус, либо обладают слабой нейтрализующей активностью [84, 112].

Тем не менее, у исследователей, занимающихся разработкой вакцин против вируса иммунодефицита человека, появился серьезный повод для оптимизма. Он связан с открытием антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении очень большого числа разнообразных штаммов ВИЧ-1 [30, 105]. Ранее уже удавалось выделить молекулы с подобными характеристиками [31, 117], однако они характеризовались меньшей авидностью и аффинностью связывания с эпитопами вируса, обладали аутореактивностью и нейтрализовали существенно меньшее число

первичных изолятов вируса. Такие антитела встречаются очень редко, и до конца 2000-х их было обнаружено не более десятка. Тем не менее, прогресс в разработке методов клеточной и молекулярной биологии позволил с 2009 года до настоящего времени выявить и охарактеризовать более 50 подобных антител [73, 86, 99, 128, 163, 167], причем некоторые из них способны нейтрализовать 90 и более процентов известных на данный момент первичных изолятов ВИЧ-1. В связи с этим вполне обоснованным выглядит мнение ряда авторитетных исследователей, полагающих, что эффективная анти-ВИЧ-1 вакцина должна вызывать индукцию таких антител [30, 70, 160, 164, 181]. Более подробно о нейтрализующих антителах широкого спектра действия (bnAbs) будет рассказано в следующей главе.

1.3. Нейтрализующие антитела широкого спектра действия

В первые годы после открытия ВИЧ-1 было очень мало информации об антителах, способных нейтрализовать этот вирус. В связи с наблюдаемой неспособностью организма самостоятельно сдерживать вирусную нагрузку было распространено мнение, что такие антитела либо вообще не появляются в организме, либо это происходит крайне редко [94, 111]. Однако позже стали поступать сообщения о ВИЧ-1 инфицированных, чьи сыворотки были способны нейтрализовать не только лабораторно-адаптированные штаммы, но и спектр первичных изолятов [41, 95, 148, 162]. Поначалу считалось, что bNabs появляются у небольшого процента ВИЧ инфицированных [111]. Тем не менее, впоследствии было установлено, что нейтрализующие антитела широкого спектра действия появляются примерно у 30 % ВИЧ-инфицированных, являющихся носителями вируса не менее года [47, 139, 148]. В самых последних опубликованных работах по данной тематике утверждается, что появление подобных антител является довольно частым явлением, их можно обнаружить не менее чем у половины хронически инфицированных больных [72]. Однако в связи с тем, что в организме больных bNabs образуются с большим опозданием, в большинстве случаев они неспособны эффективно подавлять вирус.

Хронологию открытия нейтрализующих ВИЧ-1 антител широкого спектра действия можно условно разделить на два периода.

1.3.1. Первое поколение нейтрализующих ВИЧ-1 антител широкого спектра действия

Первые сообщения об антителах с подобными характеристиками появились в начале 90-х годов прошлого века. В их число входят антитела IgG1b12, 2G12, 2F5, Z13 и 4E10.

IgG1b12 интересно тем, что было получено при помощи техники фагового дисплея, и является первым обнаруженным нейтрализующим антителом, связывающимся с CD4bs – консервативным фрагментом gp120 [31]. «Широта» нейтрализующей активности b12 оценивается по-разному: в зависимости от использованной панели различные авторы говорят о способности нейтрализовать 30-50 % используемых в эксперименте псевдовирусов/первичных изолятов (при IC₅₀<50мкг/мл) [20, 59, 91, 135]. Данное антитело было выделено в виде Fab фрагмента путем селекции из иммунной фаговой библиотеки антител, полученной из костного мозга ВИЧ-инфицированного нон-прогрессора. Сочетание тяжелой и легкой частей этого антитела было образовано случайным образом, поэтому в природе такое антитело может не встречаться [32].

Антитело 2G12 взаимодействует с $\alpha 1 \rightarrow 2$ маннозными остатками gp120 в районе переменных V3 и V4 петель [141]. Оно способно образовывать димеры путем переплетения тяжелых цепей Fab фрагментов, формируя нехарактерную для молекул IgG антиген-связывающую поверхность [168]. Был зафиксирован единичный случай выявления данного МКА в сыворотке, что подчеркивает его редкость и уникальность. Эпитоп, узнаваемый 2G12, является конформационным, его полная структура до сих пор не определена. Показано только, что она сильно зависит от гликозилирования остатков аспарагина в C2-, C3-, C4-доменах и V4 петле. 2G12 способно нейтрализовать 27-41 % изолятов ВИЧ-1 [38, 104, 164].

bNabs 2F5 и 4E10 узнают линейные перекрывающиеся фрагменты в области MPER региона. Впоследствии было сделано предположение, что в формировании узнаваемыми ими эпитопов, помимо собственно MPER, участвуют также и фосфолипиды вирусной мембраны, располагающиеся вблизи мембранно-проксимального внешнего участка [101, 119]. При этом одним Fab фрагментом антитела крепко связываются с MPER, а вторым взаимодействуют с липидами на поверхности ВИЧ-1 (хотя и менее прочно) [116]. Вероятно, благодаря этой

особенности они проявляют нейтрализующую активность в отношении очень большого числа различных штаммов ВИЧ-1: 39-60 % и 96-100 % в случае 2F5 и 4E10 соответственно [20, 38, 80, 104, 164]. В то же время было обнаружено, что оба антитела являются аутореактивными и с высокой авидностью связываются с консервативными аутоантигенами млекопитающих. Так, домен Н4 человеческой киурениназы содержит аминокислотную последовательность ELDKWA, которая полностью повторяет структуру эпитопа, узнаваемого bAb 2F5. В свою очередь, 4E10 за счет протяженного гидрофобного гипервариабельного участка тяжелой цепи связывается с третьей субъединицей фактора сплайсинга 3b (SF3B3) [170]. Аутореактивность является серьезным препятствием для создания вакцины, способной вызывать наработку в организме данных антител в достаточном количестве.

Антитело Z13, как и IgG1b12, было получено с помощью технологии фагового дисплея. Позже, с целью повышения аффинности был получен его клональный вариант Z13e1 путем внесения 5 аминокислотных остатков в области гипервариабельного участка тяжелой цепи Н3. Это позволило получить антитело, обладающее в примерно 35 раз большей силой связывания по сравнению с исходным вариантом [28, 118, 183].

Общей чертой bNAbs первого поколения является либо низкая эффективность нейтрализации, либо способность нейтрализовать ограниченное число первичных изолятов ВИЧ-1, либо полиреактивность [21]. Тем не менее, на модели приматов было показано, что использование для пассивной иммунизации смеси нейтрализующих антител b12, 4E10, 2F5 и 2G12 защищает обезьян от инфицирования вирусом SHIV89.6P. [55]. Данный факт в существенной степени поспособствовал дальнейшему развитию работ по исследованию полученных bNAbs и поиску новых молекул.

1.3.2. Второе поколение нейтрализующих ВИЧ-1 антител широкого спектра действия

Достаточно длительное время попытки получить нейтрализующие антитела с лучшими характеристиками были безрезультатны. Лишь в 2009 году удалось обнаружить молекулы, характеризующиеся более высокой эффективностью и

способностью нейтрализовать большее разнообразие первичных изолятов ВИЧ-1. Успех был обусловлен использованием комбинации трех стратегий: отбора сывороток хронических больных, содержащих высокоаффинные и кросс-реактивные нейтрализующие антитела; использования новых подходов селекции и скрининга клонов В-клеток; разработки высокопроизводительных методов выделения человеческих моноклональных антител. Поскольку открытие новых bNAbs было обусловлено применением оригинальной методики [163], следует рассказать о ней более подробно. Поиск антител производился по следующей схеме:

1. Фракция В-лимфоцитов, несущих на своей поверхности молекулы IgG, выделялась из мононуклеарных клеток периферической крови ВИЧ-1 инфицированного донора путем негативной иммуномагнитной сепарации с использованием антител к CD3, CD14, CD16, IgM, IgA, IgD. Для активации В-клеток, их пролиферации, терминальной дифференцировки и секреции антител около 30000 В-клеток памяти (CD19 + sIgG+) высевали на планшеты в присутствии питающих клеток и культуральной среды от митоген-стимулированных Т-клеток здоровых доноров. При этом подбиралась определенная плотность посева клеток, которая позволяла с наибольшей эффективностью выявлять последовательности, кодирующие антиген-специфичные вариабельные домены антител из пула, производимого множеством клонов В-клеток, в каждой лунке планшета.

2. Антитела, производимые стимулированной клеточной культурой, с помощью высокопроизводительного анализа проверяли на способность связываться с рекомбинантными мономерными формами gp120 и gp41. Параллельно проводилась оценка их нейтрализующей активности в отношении как устойчивых, так и легко поддающихся нейтрализации первичных изолятов ВИЧ-1.

3. Из культур В-клеток получали фрагменты ДНК, кодирующие тяжелые и легкие вариабельные цепи отобранных антител, путем проведения ОТ-ПЦР с использованием набора специфичных к данному семейству IgG праймеров. Набор амплифицированных участков генов тяжелых и легких цепей клонировали в составе экспрессионных векторов, которыми котрансфицировали культуру клеток для получения bNAbs [163].

Первой результативной попыткой применения нового подхода для поиска bNAbs можно считать работу, опубликованную коллективом авторов под руководством Дэнииса Бёртона [163]. Они проанализировали около 1800 сывороток ВИЧ-

инфицированных доноров из Таиланда, Австралии, Великобритании, США и Тропической Африки на способность нейтрализовать вирус и выявили те из них, которые содержали нейтрализующие антитела широкого спектра действия. В результате из сывороток африканских доноров, инфицированных ВИЧ-1 субтипа А, удалось выделить два ранее не описанных антитела PG9 и PG16. Они оказались способны нейтрализовать около 70-80 % от общего числа изолятов вируса, входивших в состав использовавшейся в эксперименте панели [73, 104, 163, 164].

Эпитоп, узнаваемый PG9 и PG16, сформирован консервативными участками V1/V2 и V3 петель гликопротеина gp120 [163]. Использование рекомбинантных белков, имитирующих структуру региона gp120 в области узнавания PG9, позволило выявить детали взаимодействия данного антитела с поверхностной детерминантой ВИЧ-1. Ключевое значение в стабилизации комплекса PG9-gp120 принадлежит CDR H3 петле тяжелой цепи антитела. Характерной особенностью является ее длина, составляющая 30 аминокислотных остатков, что позволяет ей проникать через гликановый щит и достигать консервативного участка вирусного гликопротеина в районе первой и второй вариабельной петель. Кроме того, важную роль во взаимодействии PG9/PG16 с gp120 играет образование связей между отрицательно заряженной CDR H3 петли с углеводами, связанными с остатками аспарагинов в позициях 160 (N160) и 156 (N156). Данное взаимодействие занимает более половины от общей площади при формировании пары паротоп-эпитоп [104], при этом было показано, что оно может частично имитировать природное взаимодействие env с поверхностью клетки [80]. В дальнейшем, используя аналогичный подход, в лаборатории Хэйенса были выделены антитела CH01, 02, 03, 04 [104], которые обладали схожей с PG9 и PG16 специфичностью, но нейтрализовали меньшее число различных вариантов вируса – около 46 % [24].

Другой класс антител, узнающих сильно гликозилированные участки gp120, был обнаружен 2 года спустя исследователями из International AIDS Vaccine Initiative (IAVI) под руководством Паскаля Пойгнарда [164]. Из сывороток инфицированных пациентов они выделили четыре набора клонально родственных антител PGT121-123, PGT125-131, PGT135-137 и PGT141-145, сравнимых с PG9 по количеству нейтрализуемых изолятов (33 %-78 %), но обладающих большей эффективностью: их значения IC₅₀ и IC₉₀ были в 10 раз меньше, чем в случае PG9, PG16, и в 100 раз ниже по сравнению с описанными ранее bnAbs b12, 2G12 и 4E10 (IC₅₀ и IC₉₀ –

концентрации, при которых происходит 50 и 90 %-ное ингибирование активности вирусных частиц соответственно) [164]. Дегликозилирование gp120 полностью блокирует связывание всех этих антител, что говорит о важности гликанов для распознавания эпитопа. N-связанный гликан в позиции 332 критичен для нейтрализующей активности всех антител. Антитела PGT121-123 узнают участок, расположенный вдоль полипептидного каркаса gp120, но конформация эпитопа определяется наличием гликана в позиции 332. В свою очередь PGT125-128, 130 связываются с остатками Man₈GlcNAc₂ и Man₉GlcNAc₂ [164].

Совсем недавно с использованием схожего с описанным для PG9/PG16 метода, научным коллективом под руководством Марка Коннора [73] было выделено bnAb 10E8. Оно связывается с консервативным участком в районе MPER-региона, который в значительной степени перекрывается с эпитопом, узнаваемым антителом первого поколения 4E10, однако не контактирует с вирусом в области липидного бислоя. Особенностью МКА 10E8 является высокий уровень соматических мутаций в генах VH и VL, возникающих в процессе аффинного созревания. Данное антитело нейтрализует около 98 % известных изолятов ВИЧ при концентрациях в 5-10 раз более низких, чем 4E10, при этом, в отличие от последнего, оно не проявляет аутореактивности [73].

Другой подход был предложен Джоном Маскола с соавторами [90]. В качестве мишени для поиска нейтрализующих антител они использовали не все вирусные белки, а только CD4bs гликопротеина gp120. С этой целью они сконструировали молекулы-«наживки», представляющие собой рекомбинантные формы gp120 с измененной поверхностью. Такие молекулы были названы стабилизированными молекулами на основе gp120 с измененной поверхностью, или RSC (Resurfaced Stabilized Core). В отличие от природного gp120, у RSC удалены 3 вариабельные петли для обеспечения лучшего доступа антител к требуемой области. Кроме того, с помощью мутагенеза были проведены замены аминокислотных остатков таким образом, чтобы ни одна область, за исключением CD4bs, не распознавалась циркулирующими в организме антителами. Кроме того, для проведения негативной селекции был получен вариант ΔRSC, имеющий мутантный участок связывания с CD4. С использованием RSC авторами были отобраны сыворотки ВИЧ-положительных пациентов, содержащие антитела к CD4bs. Из их крови было выделено более 25 миллионов В-клеток памяти, которые инкубировали с RSC и

ΔRSC, помеченными флуорохромами. Затем при помощи клеточного сортера были отобраны редко встречающиеся В-лимфоциты, специфичные только к CD4bs. С использованием single-cell ОТ-ПЦР из каждой отдельной клетки получали фрагменты ДНК, кодирующие легкие и тяжелые цепи антител, и клонировали в составе специализированных векторов экспрессии. Моноклональные антитела получали котрансфицированием культуры клеток 293Т. В результате были получены МКА VRC01, имеющие очень широкий спектр действия и одновременно обладающие высокой эффективностью – они нейтрализовали около 90 % протестированных вариантов ВИЧ при концентрации менее 1 мкг/мл (вычислено для IC₅₀). Для VRC01, так же как и для 10E8, характерен очень высокий уровень соматических мутаций. Кроме того, их уникальной характеристикой является способность имитировать связывание CD4 рецептора Т-хелперов с gp120 ВИЧ-1. При этом, как и CD4-рецептор, при связывании с вирусом они вызывают изменение конформации мономерного gp120 [90].

Несколько ранее группа исследователей под руководством Майкла Нюссенцвиг провела эксперимент по выявлению антител, связывающихся со всеми участками gp120, путем сортирования В-клеток [143]. Они обнаружили в сыворотках ВИЧ-инфицированных 576 нейтрализующих антител, большая часть которых оказалась клонально схожими с bnAb VRC01. По мнению авторов, наиболее интересными среди них в плане вируснейтрализации являются МКА NIH45-46, 3BNC117, 3BNC55, 3BNC60, 8ANC131 и 12A12. Наилучшие результаты в плане нейтрализации продемонстрировало антитело 3BNC117, которое при использовании панели из 118 псевдовирусов всех возможных субтипов оказалось способно нейтрализовать 95 из них, причем при низкой концентрации [143]. По другим данным это антитело было способно нейтрализовать 151 из 180 изолятов (84 %) при концентрации IC₅₀ < 50 мкг/мл, [73]. Антитело NIH45-46 обладало более широкой нейтрализующей активностью в подвыборке из 62 псевдовирусов в сравнении с VRC01, но меньшей, чем 3BNC117. Несколько позже был получен его клональный вариант NIH45-46^{GW}, который обладал аналогичной нейтрализующей способностью, однако при существенно меньшей концентрации [44]. Вместе эти два антитела (NIH45-46 и 3BNC117) нейтрализовали 115 из 118 входящих в состав панели псевдовирусов. МКА 8ANC195 обладало умеренной нейтрализующей активностью, но при этом было способно нейтрализовать 2 псевдовируса, резистентных к VRC01,

причем нейтрализацию одного из этих псевдовирусов обеспечивало только данное антитело. Следует отметить, что все эти антитела, за исключением 8ANC195, аналогично VRC01, вызывают конформационные изменения мономера gp120 при связывании с CD4bs [144].

Большое разнообразие нейтрализующих антител широкого спектра действия, полученных в последнее время, дает основание полагать, что создание эффективной вакцины против ВИЧ-1 возможно. Дополнительным подтверждением данной точки зрения служат вышеупомянутые результаты исследований на низших приматах, которые показали, что нейтрализующие антитела широкого спектра действия способны полностью блокировать инфицирование вирусом иммунодефицита обезьян [30, 71, 99, 124]. Кроме того, введение ВИЧ-инфицированным bNAbs после отмены антиретровирусной терапии позволяло увеличить период отсутствия симптомов СПИДа [159]. В сравнительно недавних исследованиях было продемонстрировано, что внутримышечная иммунизация гуманизированных мышей и низших приматов векторами на основе аденоассоциированного вируса, несущими гены тяжелых и легких цепей bNAbs (под контролем CMV промотора), вызывала выработку в организме животных соответствующих нейтрализующих антител. Часть этих bNAbs полностью предотвращала инфицирование вирусом иммунодефицита [11, 18].

Флориан Кляйн с соавторами показали, что пассивная иммунизация трансгенных мышей смесью из пяти антител широкого спектра действия PG16, PGT121, PGT128, 3BC176 и 45-46^{G54W} эффективно подавляет репликацию ВИЧ-1, и еще в течение 60 дней после окончания курса поддерживает контроль над ним, в то время как современные противовирусные лекарственные препараты требуют ежедневного приема [86].

В 2014 г. группа исследователей под руководством Энтони Фаучи опубликовала результаты экспериментов *ex vivo* с лимфоцитами, выделенными из инфицированных пациентов [36]. Они показали, что антитела PGT121, VRC01 и VRC03 обладают способностью подавлять проникновение ВИЧ в CD4-клетки а также полностью блокировать репликацию ВИЧ в CD4-клетках, взятых от получавших АРТ ВИЧ-инфицированных. В настоящее время запущен ряд клинических испытаний для более детальной проверки полученных данных и сформулированных гипотез.

Обобщая все вышесказанное, можно отметить, что появление новых технологий высокопроизводительного выделения антител в сочетании со сложными

стратегиями скрининга популяций В-клеток позволило достичь значительного прогресса в области исследования гуморального ответа при ВИЧ-инфекции. Были обнаружены консервативные области поверхностных гликопротеинов gp120 и gp41, уязвимые к действию нейтрализующих антител. Кроме того, исследователям удалось добиться более глубокого и четкого понимания путей развития иммунного ответа, ведущих к образованию нейтрализующих антител широкого спектра действия. Наконец, было показано, что bnAbs при введении обезьянам способны защищать их от заражения ВИО, генетически очень близкого к ВИЧ.

Таким образом, не вызывает сомнений идея о необходимости создания профилактической вакцины, основной задачей которой является превентивное формирование пула нейтрализующих антител широкого спектра действия. Однако при попытках ее реализации у исследователей возник ряд новых проблем, о которых более подробно будет рассказано в следующей главе.

1.4. Подходы к решению задачи создания эффективного иммуногена, обеспечивающего индукцию антител широкого спектра действия

Большинство известных bnAbs обладают очень необычными характеристиками, которые могут осложнять их эффективную индукцию в организме. Так, для некоторых из них характерно большое число соматических мутаций, возникающих в процессе аффинного созревания. Зачастую их зародышевые предшественники настолько отличаются от зрелых форм, что вообще не взаимодействуют с эпитопами, узнаваемыми нейтрализующими антителами [103, 166]. В связи с этим возникает вопрос, каким же образом за счет иммунизации можно воспроизвести весь путь созревания В-клеток, способных в конечном итоге синтезировать широконейтрализующие антитела [68, 169].

Кроме того, длительное аффинное созревание (которое может продолжаться более года) приводит к тому, что bnAbs появляются в организме с сильным опозданием, и к этому моменту уже не способны эффективно подавлять вирус.

Как уже отмечалось ранее, довольно часто нейтрализующие антитела широкого спектра действия проявляют поли- и аутореактивность [96, 161]. Было показано, что в некоторых случаях их индукцию ограничивает механизм аутоотолерантности и деактивации В-клеток, мишенями которых являются собственные антигены

организма. Это является достаточно существенной проблемой, поскольку добиться высокой концентрации подобных антител в сыворотках становится непросто. Веркочи с соавторами провели эксперимент с использованием knock-in мышей, которым ввели гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи как зрелых антител 2F5, так и их зародышевых форм. В результате было показано, что уровень полиреактивности, проявляемый обеими формами антител, оказался достаточным для того, чтобы в костном мозге произошла элиминация 95% В-клеток, синтезирующих их предшественников. Тем не менее, не все 2F5-продуцирующие В-клетки подверглись уничтожению: некоторое их количество обнаруживалось в периферических лимфоузлах и селезенке в инактивированном состоянии [161]. Согласно неопубликованным данным того же автора, эти неактивные В-клетки можно активировать путем многократной иммунизацией животных пептидом из узнаваемого 2F5 эпитопа, находящегося в окружении липидов.

Помимо перечисленных выше особенностей, стоит отметить еще одну, которая также является серьезной проблемой для разработчиков bnAb-индуцирующих иммуногенов. Многие широконейтрализующие антитела узнают конформационные эпитопы вируса, представляющие собой комбинацию аминокислотных остатков из разрозненных участков полипептидной цепи, но за счет третичной (а иногда и четвертичной) структуры участков вирусных белков формирующих антигенную детерминанту. Более того, часть нейтрализующих антител широкого спектра действия связывается не напрямую с аминокислотными остатками, входящими в состав вирусных белков, а с гликанами на их поверхности. Некоторые, напротив, узнают эпитопы, сформированные комплексом а.о., скрытых глубоко под гликановым щитом. Такие антитела имеют очень длинные гипервариабельные петли третьего домена антиген-связывающего участка тяжелых цепей (CDR-H3), благодаря которым они способны проникать сквозь плотную сеть пептидогликанов и достигать консервативных участков вирусных белков. Однако по этой же причине они (и узнаваемые ими эпитопы) имеют очень сложную пространственную структуру. Данные особенности существенно усложняют теоретический расчет и получение искусственной молекулы, способной повторить структуру нативного эпитопа. В качестве примера на рис. 4 схематично представлен фрагмент гликопротеина gp120, с которым связывается нейтрализующее антитело широкого спектра действия 2G12.

Узнаваемый им эпитоп располагается в области переменных петель V3 и V4 и сформирован олигоманнозными остатками, обозначенными фиолетовым цветом.

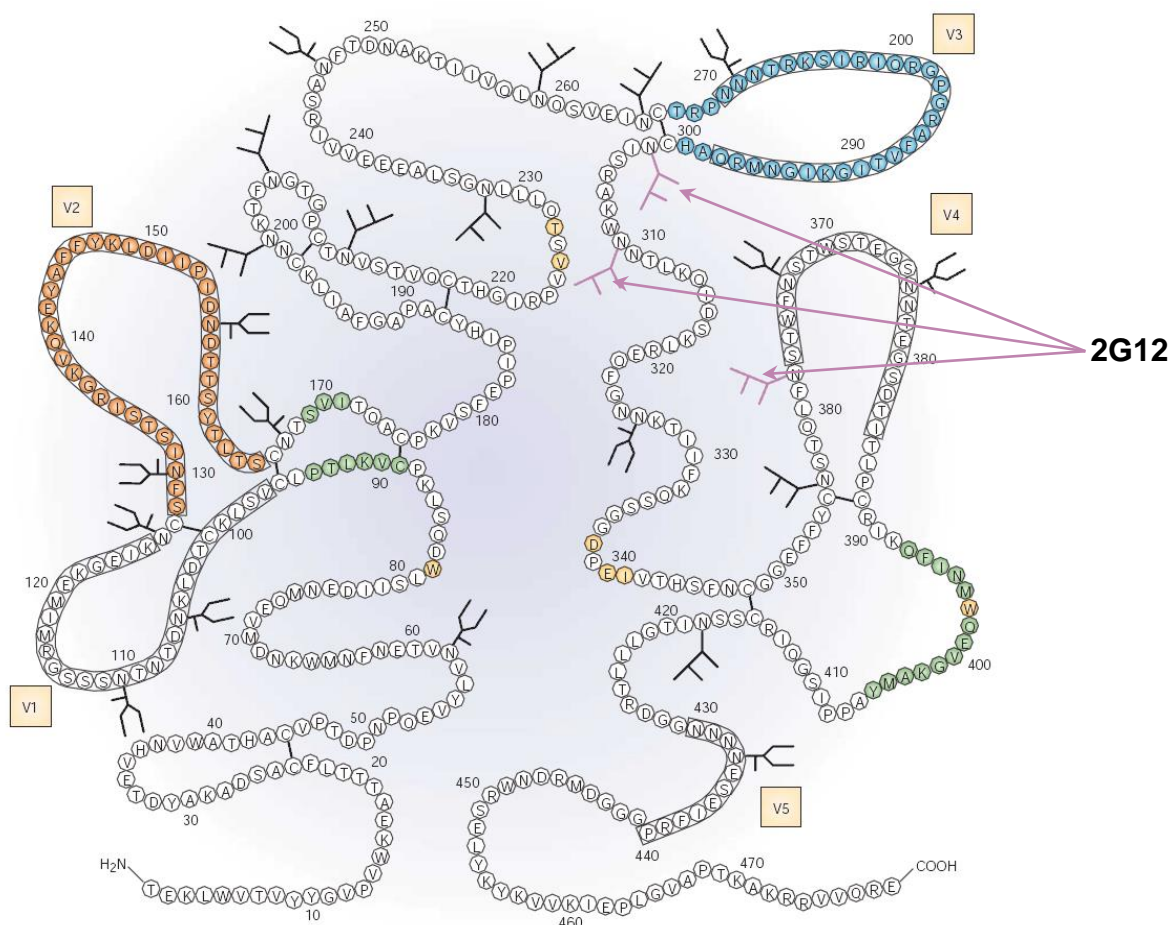


Рис. 4. Схематичное изображение фрагмента gp120 в области переменных петель (V1-V5). Черными "веточками" обозначены позиции потенциальных сайтов N-гликозилирования. Остатки, которые формируют эпитопы, узнаваемые bNAbs, обозначены цветами: синим – участок узнавания антителами 19b, 447/52-D, зеленым – 17b, 48D, оранжевым – 697-30D, желтым – IgG1b12 [180]. Фиолетовым цветом выделены $\alpha 1 \rightarrow \alpha 2$ олигоманнозные остатки, которые формируют эпитоп, узнаваемый антителом 2G12

Ниже в таблице 1 представлен перечень упомянутых ранее bNAbs с указанием их некоторых особенностей. Антитела разделены на группы по участку связывания с ВИЧ-1, указана структура узнаваемых ими эпитопов (в случае если она известна), дана информация о широте нейтрализации, длине CDR-H3 домена, наличии/отсутствии поли- и аутореактивности количестве соматических мутаций и дате обнаружения.

Таблица 1

Характеристики ВИЧ-1 нейтрализующих антител широкого спектра действия

Участок связывания	Клональное семейство	Антитело	Структура эпитопа	ШН ¹	Длина HCDR3 ²	НР/АР ³	СМ ⁴	Год выделения	Ссылки
MPER gp41	2F5	2F5	ELDKWA	60-70%	24	Нет/Да	15,2%	1994	[20, 35, 61, 73, 96, 117, 163, 170, 179]
	4E10	4E10	WFD(I/L)(T/S)NW(L/I)WYIK	96-98%	20	Да/Да	15,6%	1994	[33, 35, 38, 61, 73, 96, 118, 163, 184]
	10E8	10E8	WFDITNWIWYIL/R	98%	22	Нет/Да	22,1%	2012	[35, 61, 73, 96, 118]
	Z13e1	Z13e1	WASLWNWFDITN	50%	19	н.д.	17%	1994	[114, 118, 126]
Гликаны V3-петли gp120	2G12	2G12	Конформационный, сформирован олигоманнозными остатками, принимающими участие в N-гликозилировании V4-петли и участках C2, C3, C4	70-75%	16	Нет/Нет	33,6%	2011	[28, 38, 45, 96, 143, 163]
	PGT125-131	PGT125	Конформационный, сформирован олигоманнозными остатками и β-складчатостью на С-конце V3 петли	52%	21	Да/Нет	н.д.	2011	[96, 164]
		PGT128	Конформационный, сформирован олигоманнозными остатками и β-складчатостью на С-конце V3 петли	50%	21	Да/Нет	27,9%	2011	[96, 164]
	PGT121-123	PGT121	Конформационный, образован комплексом N-гликанов с большим содержанием маннозы в позиции N332 на V3 петле	65-70%	26	Нет/Нет	21,2%	2011	[96, 115, 164]
	PGT135-137	PGT135-	Конформационный, сформирован	55-60%	26	н.д.	26,8%	2012	[164]

		137	олигоманнозными остатками на V3-петле						
Гликаны V1/V2-петель gp120	PGT141-145	PGT145	Конформационный, имеет четвертичную структуру, образован N-гликанами в области V2-V3-петель	30-35%	20	Нет/Нет	22,8%	2011	[96, 164]
	PG9/PG16	PG9	Конформационный, имеет четвертичную структуру, образован N-гликанами в области V2-V3-петель	77-79%	30	Да/	15,4%	2009	[96, 104, 125, 164]
		PG16	Конформационный, имеет четвертичную структуру, образован N-гликанами в области V2-V3-петель	73-74%	30	Нет/Нет	16,8%	2009	[35, 73, 96, 163]
	CH01-CH04	CH01	Конформационный, имеет четвертичную структуру, образован N-гликанами в области V1-V2 и V2-V3-петель	45%	24	Нет/Нет	23,3%	2011	[24, 96]
		CH03	Конформационный, имеет четвертичную структуру, образован N-гликанами в области V1-V2 и V2-V3-петель	45%	26	Да/Да (CH03)	19,5%	2011	[25]
CD4bs gp120	IgG1b12	IgG1b12	Конформационный, частично перекрывается с CDbs	34-47%	18	Да/Да	17,3%	1991	[12, 31, 38, 96, 164, 167, 176]
	HJ16	HJ16	Конформационный, частично перекрывается с CDbs	36%	21	Нет/Нет	36,7%	2010	[38, 166]
	VRC01-VRC04	VRC01	Конформационный, перекрывается с CDbs	90-93%	14	Нет/Да	38,8%	2010	[96, 144, 164, 166, 177]
		VRC03	Конформационный, перекрывается с CDbs	50%	16	Нет/Нет	34,9%	2010	[96, 166, 167]
		3BNC117	Конформационный, перекрывается с CDbs, в формировании участвуют N-гликаны	85-90%	12	н.д./Да	36,9%	2011	[73, 144]
		PGV04	Конформационный, перекрывается	76-88%	16	н.д./н.д.	38,2%	2011	[164, 166]

CD4bs	VRC01- VRCPG04		с CDbs, в формировании участвуют N-гликаны						
		3BNC60	Конформационный, перекрывается с CDbs, в формировании участвуют N-гликаны	н.д.	12	Нет/Нет	36,9%	2011	[144]
		NIH45-46 ^{GW}	Конформационный, перекрывается с CDbs, в формировании участвуют N-гликаны	90%	18	Да/Да	44%	2011	[44, 73, 96, 144]
		CH31	Конформационный, перекрывается с CDbs, в формировании участвуют N-гликаны	80%	15	Да/Нет	31,9%	2011	[96, 166]
		12A12	Конформационный, перекрывается с CDbs	97%	15	н.д./н.д. .	н.д.	2011	[144]
	3BC176	3BC176	Конформационный, расположен в области между V3-петлей и CD4i	64%	19	н.д./н.д. .	29,4%	2012	[86]

1) ШН – Приблизительная ширина нейтрализации, которая вычислялась для значения IC50, достигаемого при концентрации МКА менее 50 мкг/мл. Указан процент вирусных изолятов (от общего числа в используемых панелях), в отношении которых антитела проявляли нейтрализующую активность

2). Длина 3 домена гипервариабельного участка тяжелых цепей, выраженная в числе а.о. Расчет производился с использованием базы данных международной информационной системы ImMunoGeneTics (IMGT)

3) ПР/АР – полиреактивность/аутореактивность

4) СМ – Процент аминокислотных соматических гипермутаций, рассчитанных для полных последовательностей путем сравнения участков VDJ-рекомбинации исходных (мутантных) и первичных (кодируемых генами клеток зародышевой линии) антител. Расчет производился с использованием базы данных международной информационной системы ImMunoGeneTics (IMGT). Вставки и делеции при вычислениях не учитывались

Принимая во внимание данные особенности, а также предыдущие неудачные попытки создания иммуногена, ведущими исследователями в области изучения нейтрализующих антител широкого спектра действия была сформулирована концепция вакцины нового поколения. Согласно ей, для эффективной индукции нейтрализующих антител широкого спектра действия необходимо:

- обеспечить процесс аффинного созревания антител в направлении генерации bnAbs;
- направить иммунный ответ на строго определенную область антигена, точно соответствующую целевому консервативному эпитопу, путем удаления или замены фрагментов иммуногена, которые могут быть потенциально иммунодоминантными;
- стимулировать В-клетки, несущие немутированные зародышевые антитела, являющиеся предшественниками зрелых форм bnAbs.

В качестве примера последних разработок можно привести работы, проводимые научной группой Янга, Ковакса и Бертона. Основной принцип заключается в разработке растворимых рекомбинантных антигенных имитаторов функциональных тримеров gp120, способных имитировать нативную конформацию поверхностного белка Env [88, 171, 172]. В отличие от них, Чжоу с соавторами предложили использовать в качестве иммуногена мономерную стабилизированную форму оболочечного гликопротеина вируса для индукции антител к CD4bs – ключевому участку gp120, ответственному за связывание с CD4. Для получения иммуногена сердцевина белка Env модифицировалась с помощью направленного мутагенеза таким образом, чтобы полученная конструкция имитировала CD4bs сайт [167, 176, 177]. Еще один вариант создания CD4bs-иммуногена предложили Квон с соавторами. Описанный ими подход основан на компьютерном предсказании структуры эпитопов и их размещении в каркасе молекул-носителей [90].

Перечисленные стратегии подразумевают использование для иммунизации нескольких рекомбинантных молекул gp120, подобных тем, с помощью которых были обнаружены некоторые bNAbs. Однако данный метод больше подходит в качестве бустера при prime-boost стратегии вакцинации, поскольку направлен на стимуляцию только гуморального звена иммунного ответа. В то же время, согласно последним данным, для наиболее эффективной индукции антител необходима кооперация с CD4+ клетками, т.е. в качестве праймирующего компонента нужно использовать Т-клеточный

иммуноген. Кроме того, создание рекомбинантных форм гликопротеина gp120 и его производных – это очень сложный и трудоемкий процесс [102].

На наш взгляд, перспективным подходом к созданию иммуногена, вызывающего наработку bNAbs, является получение полиэпитопной конструкции, в состав которой входят линейные пептиды-имитаторов эпитопов, узнаваемых нейтрализующими антителами. Теоретически это позволяет индуцировать наработку сразу нескольких антител широкого спектра действия, причем даже тех, которые узнают сложно организованные конформационные эпитопы. Было показано, что при продолжительной циркуляции ВИЧ-1 в организме больного вирус может приобретать устойчивость к нейтрализации [53], поэтому наиболее эффективную защиту может обеспечить вакцина, индуцирующая наработку одновременно нескольких bnAbs. Кроме того, автоматически разрешается вопрос, как придать эпитопам, узнаваемым bNAbs, правильную конформацию в составе иммуногена, и каким образом обеспечить их стабильность. Еще одним потенциальным достоинством использования имитаторов является отсутствие возможности смещения иммунного ответа на переменные иммунодоминантные области.

Для получения пептидов-имитаторов антигенных детерминант используются разнообразные методы комбинаторной биологии. В частности, при изучении антител к ВИЧ-1 активно применяется технология фагового дисплея, поскольку это один из самых простых и эффективных методов для картирования эпитопов и изучения многочисленных белок-белковых взаимодействий [39, 60].

1.5. Метод фагового дисплея

Бактериофаги (фаги) представляют собой вирусы, которые размножаются на бактериях. Их геном представлен в виде молекул ДНК или РНК, которые упаковываются в капсид, состоящий из поверхностных белков. Общий принцип метода фагового дисплея выглядит следующим образом: последовательность ДНК, кодирующую целевой полипептид, объединяют с фаговым генетическим материалом, в результате чего он экспонируется на поверхности фаговых белков капсида в иммунологически доступной форме. Возможность получения жизнеспособных частиц бактериофагов, несущих в составе поверхностных белков чужеродные пептиды, была

впервые продемонстрирована на нитчатых фагах fd и M13 [1, 150], а затем на лизогенном бактериофаге λ , литических T4 и T7 [15]. Основоположником метода является Дж. Смит, который первым создал вектор для экспонирования на поверхности нитчатого бактериофага fd чужеродных белков и пептидов, используя для этих целей минорный белок оболочки. Он объединил фрагмент ДНК, кодирующий фрагмент эндонуклеазы рестрикции EcoRI *Escherichia coli*, с геном минорного белка оболочки рIII, который представлен на поверхности фаговых частиц в количестве 5 копий на вирион [150]. Смит показал, что полученные фаги, несущие химерные белки EcoRI-рIII, способны связываться со специфичными к EcoRI антителами. Тем самым была подтверждена возможность экспрессии чужеродных генов в составе фаговых частиц. Далее им было продемонстрировано, что из смеси, содержащей как рекомбинантные фаги, так и фаги дикого типа, с помощью иммобилизованных на планшет антител к EcoRI можно отобрать фаговые клоны, экспонирующие фрагмент эндонуклеазы. В дальнейшем Ильичевым с соавторами была показана возможность использовать в качестве носителя чужеродной встройки основной белок оболочки рVIII, представленного в вирионе бактериофага M13 почти тремя тысячами копий на вирион [2, 76, 109]. Экспрессия в виде гибрида с рVIII обеспечивает мультивалентный дисплей, применяющийся при селекции низкоаффинных лигандов или для получения эффективных иммуногенов, хотя вследствие малого расстояния между копиями белка рVIII на размер встройки накладываются определенные ограничения [3, 5, 97].

1.5.1. Фаговые пептидные библиотеки

Логическим продолжением этих работ явилось создание фаговых пептидных библиотек. Библиотеки были получены путем встройки набора вырожденных олигонуклеотидов, кодирующих пептидные рандомизированные последовательности, в состав генов белков оболочки нитевидных бактериофагов [146]. Библиотеки сконструированы таким образом, что чужеродный пептид, находясь на N-конце рекомбинантного белка, располагается на поверхности вириона и доступен для взаимодействия с белком-лигандом, использующимся для аффинной селекции [151].

В настоящее время разработано множество различных векторных систем, используемых для создания библиотек бактериофагов. Для экспонирования чужеродных

белков на поверхности фагов используются преимущественно белки рIII и рVIII. Пептиды встраивают сразу после сигнальной последовательности белков оболочки вируса на N-конце. Это связано с тем, что N-концы белков, обладают большей подвижностью и, соответственно, более доступны антителам. Для этого используется либо полноразмерный фаг, либо фагмидный вектор в комбинации с фагом-помощником [82, 122, 157]. Белок рIII позволяет встраивать достаточно большие вставки длиной от 6 [146] до 38 аминокислотных остатков [81], и при этом не теряет своей функциональной активности, в то время как рVIII перестает функционировать при вставке длиной более 8 а. о. [76, 85, 109]. Чтобы избавиться от ограничений, связанных с размером встройки, были созданы системы, в которых инфекционность или способность к нормальной сборке вирионов, утраченные при встройке длинных последовательностей, можно восстановить путем введения т.н. фага-помощника. Он несет дополнительный ген, с которого осуществляется синтез молекул белка рVIII дикого типа. В этом случае оболочка бактериофага будет содержать как измененные белки рVIII, так и полипептиды дикого типа от вируса-помощника, и инфекционность не будет нарушена [152]. Векторные системы для дисплея пептидов на основе белка рVIII дали развитие новому типу библиотек, разработанных в лаборатории Дж. Смита и названных ландшафтными [127].

В общем виде процедура отбора пептидов с использованием фагового дисплея, называемая биопэннингом (или аффинной селекцией), представлена на рис. 5. В том случае, если бактериофаг несет пептид, имеющий высокое сродство к соответствующим антителам или связывающемуся белку, его можно легко отобрать из библиотеки, даже если он единичный среди большого числа несвязывающихся клонов.

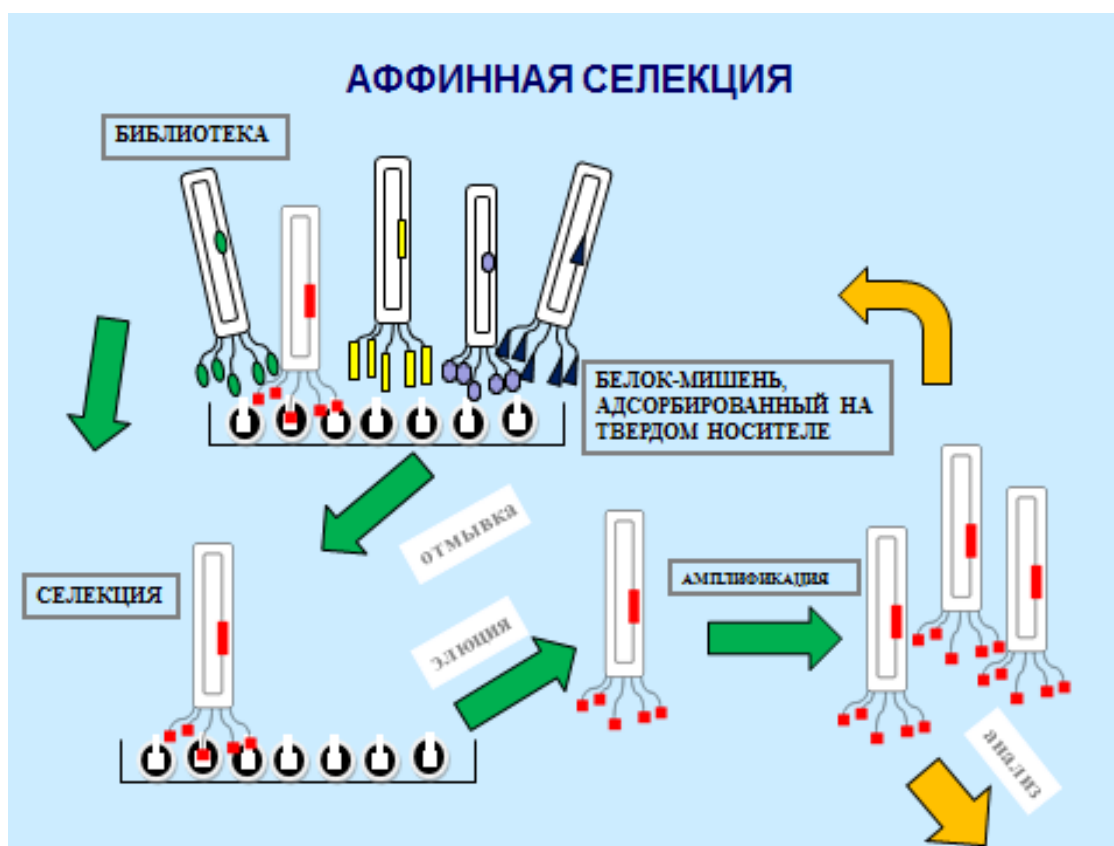


Рис. 5. Схема проведения аффинной селекции. Фаговые частицы инкубируют с лигандом, который иммобилизован на твердой поверхности парамагнитных частиц или плашек для титрования, либо находится в растворе. По окончании селекции в растворе фаг в комплексе с лигандом задерживается на твердой фазе, например, с использованием биотинилированного лиганда и стрептавидиновой матрицы. Несвязавшиеся фаговые частицы отмываются, и специфически связанный с лигандом фаг элюируют, после чего его используют для заражения новых клеток *E. coli* с целью амплификации отобранных клонов. В результате происходит обогащение фагового пула бактериофагов, экспонирующих на своей поверхности пептиды/белки, специфически связывающиеся с лигандом [131]. Трех раундов аффинной селекции обычно достаточно для получения обогащенной популяции фагов, содержащих целевые последовательности. Лиганд обычно иммобилизован на твердом носителе, в качестве которого может служить пластик, магнитные частицы или даже клетки и ткани

1.5.2. Возможности технологии фагового дисплея

Технология фагового дисплея является универсальной. Она позволяет легко обрабатывать очень большой массив данных и проводить высокопроизводительный скрининг одновременно миллиардов последовательностей. Существенным достоинством технологии является то, что она позволяет выявлять аналоги не только линейных, но и конформационных эпитопов, или мимотопов. Концепцию мимотопов сформулировал в 1986 году Марио Джейсен [62], суть которой заключается в следующем: во многих случаях нековалентные связи, которые возникают между

несколькими аминокислотными остатками лиганда и связывающейся с ним молекулы или лигандом, вносят большой вклад в общую энергию связи. Поэтому короткие пептиды, критические для связывания, могут химически имитировать сложные антигенные детерминанты белков. Иными словами, методом фагового дисплея можно получить линейные пептиды, способные в иммунологическом плане имитировать конформационные антигенные детерминанты.

Существуют разные типы фаговых библиотек, позволяющие экспонировать пептиды, белки, фрагменты иммуноглобулинов и другие последовательности, которые могут дополнительно использоваться для различных целей, включая диагностику заболеваний, получение лекарственных средств и терапевтических антител, картирование эпитопов и др. Вполне закономерно, что технология фагового дисплея также активно применялась в исследованиях, связанных с изучением ВИЧ-1. Можно отметить четыре основных приложения фагового дисплея, наиболее широко использовавшихся при исследовании вируса иммунодефицита:

1) Картирование эпитопов – скрининг рандомизированных пептидных библиотек с использованием иммобилизованных моноклональных или поликлональных антител для определения линейных и/или конформационных эпитопов, узнаваемых этими антителами. Такая селекция обычно приводит к обнаружению последовательностей (мимотопов), имитирующих исходный эпитоп. Зачастую эти данные позволяют точно определить взаимное расположение аминокислотных остатков, формирующих участок узнавания антителом. В свою очередь, мимотопы могут выступать в качестве компонентов иммуногенов для наработки антител к нативным эпитопам. Данный подход известен как «обратная вакцинология».

2) Поиск ингибиторов вирусных ферментов – исследования, основанные на скрининге библиотеки бактериофагов, экспонирующих рандомизированные пептиды или фрагменты антител против вирусных белков или белков клетки-хозяина, которые участвуют в процессе репликации вируса.

3) Подход, при котором на поверхности фагов экспонируются потенциальные последовательности (субстраты) для ферментов ВИЧ-1, к примеру, вирусной протеазы. Такой подход не только позволяет получить данные по протеолитическому расщеплению, но и дает информацию, необходимую для разработки специфических ингибиторов.

4) Использование фаговой частицы в качестве носителя иммуногенов – подход, при котором бактериофаг выступает в качестве носителя экзогенных пептидов или даже крупных антигенов, представляя их иммунной системе, с целью индукции специфического гуморального и/или цитотоксического Т-клеточного ответа.

В следующей главе будут описаны эксперименты, проводившиеся с использованием фаговых пептидных библиотек, и направленные на изучение структуры антигенных детерминант ВИЧ, картирования bnAbs и попытки получения иммуногенов.

1.5.3. Применение технологии фагового дисплея при изучении ВИЧ-1

1.5.3.1. Изучение антигенной структуры белков ВИЧ-1

В литературе описано достаточно много примеров, когда метод фагового дисплея оказался полезным при изучении антигенной структуры ВИЧ-1. С помощью этого метода Стерн с соавторами **исследовали антигенную структуру консервативного домена С1 белка gp120**. Чтобы проанализировать два мышиных моноклональных антитела (GV1A8 и GV4D3), связывающихся с неперекрывающимися последовательностями в области 1-142 а.о. gp120 [40, 155], они использовали 20-мерную библиотеку. Процедура биопэннинга с использованием МКА GV1A8 позволила выявить консенсусную последовательность (L/I)W, совпадающую с остатками 111-112 в домене С1, а среди них мотив NxxIxxLW, соответствующий двум виткам α -спирали. С помощью компьютерного моделирования было подтверждено, что остатки, формирующие эпитоп GV1A8, смежно расположены на одной стороне спирали. Аналогично, процедура биопэннинга с использованием антитела GV4D3 позволила выявить последовательности, имеющие общий мотив N_{x3}W_{xx}D. Компьютерное моделирование последовательности FNMWKND также подтвердило спиралевидную структуру последовательности F_{xx}W_{xx}D. Данные исследования показывают, что использование метода фагового дисплея позволило не только предсказать α -спиральную структуру домена С1 gp120, но и точно определить остатки на поверхности спирали, принимающие участие в связывании с антителами.

В качестве другого примера успешного применения фагового дисплея можно привести работу, посвященную **исследованию особенностей структурной**

организации С-концевого фрагмента gp120. Данный участок образует структуру, напоминающую по форме карман, с помощью которого он способен взаимодействовать с gp41. Исследовательским коллективом авторов было сделано предположение, что в момент связывания ВИЧ-1 с CD4 рецептором С-конец gp120 претерпевает конформационные изменения, ослабляющие его взаимодействие с gp41. На момент проведения работы еще отсутствовали кристаллографические данные о структуре С-конца gp120, и для изучения эпитопов, перекрывающихся с областью "кармана", Феррер с соавторами решили использовать мышиные МКА 803-15.6 [56]. Ранее было проведено картирование эпитопа, узнаваемого 803-15.6, с помощью эксперимента по кросс-блокированию с использованием фрагментов gp120 различной длины. Полученные данные указывали на то, что эти антитела узнают район 502-519 а.о. Однако с использованием метода фагового дисплея удалось уточнить и скорректировать эту информацию. Скрининг гептапептидной фаговой библиотеки с использованием МКА 803-15.6 позволил выявить фаги с консенсусным мотивом **AxxKxRH**, гомологичным остаткам 502-508 на gp120. Изучение аффинности взаимодействия фагов с МКА подтвердило, что на N-конце данного эпитопа располагается остаток аланина. Также было показано, что аффинность пептидов увеличивается при добавлении С-концевых а.о.

1.5.3.2. Исследование нейтрализующих ВИЧ-1 антител с использованием фагового дисплея

Поиск пептидов-имитаторов эпитопа, узнаваемого МКА 447-52D. Хорошим примером использования метода фагового дисплея является также работа, выполненная Келлером с соавторами [83]. Ими было показано, что пептиды из фаговой библиотеки, отобранные в результате аффинной селекции против нейтрализующего ВИЧ-1 антитела широкого спектра действия, могут индуцировать специфичный гуморальный иммунный ответ при иммунизации кроликов. Следует отметить, что это была одна из первых опубликованных работ, в которых была продемонстрирована эффективность имитаторов эпитопов, узнаваемых нейтрализующими антителами, в качестве иммуногенов. Научным коллективом был проведен скрининг 15-ти мерной фаговой пептидной библиотеки против bnAb 447-52D, которые узнают фрагмент V3 петли

гликопротеина gp120 (KRKRINIGPGRIFY) [65], и отобрали 70 клонов, среди которых выявили консенсусную последовательность **GPxR** [83]. Полученные мимотопы были использованы в экспериментах по иммунизации кроликов. Было продемонстрировано, что они вызывают у животных наработку ВИЧ-1-нейтрализующих антител.

В том же году Джеллис с соавторами опубликовали работу, в которой технология фагового дисплея применялась для картирования эпитопа **МКА 58.2**, узнающего фрагмент V3 петли ВИЧ-1 штамма MN [136]. В своих исследованиях они использовали 20-ти мерную фаговую пептидную библиотеку. Процедуру аффинной селекции проводили в соответствии с двумя различными протоколами: в одном случае использовались биотин-меченные МКА 58.2 (SA-Bio), имеющие большое сродство к стрептавидину, в другом производилась прямая сорбция антител на лунки микропланшетов (microman) [79]. Фаги, отобранные с помощью SA-Bio-протокола, имели общую консенсусную последовательность (Y/L)(V/L/I)GPGRxF, гомологичную последовательности V3 петли. Протокол microman также позволил выявить последовательности, имеющие сходный мотив, и две из них совпали с последовательностями SA-Bio. Специфичность отобранных в результате биопэннинга пептидов в дальнейшем была подтверждена с помощью метода гибридизации массива пептидов (peptide array hybridization assays). Антитела 58.2 гибридизовали с 14-мерными пептидами, содержащими все возможные точечные замены, а затем инкубировали с пептидной последовательностью V3 петли. Было продемонстрировано, что независимое проведение гибридизации и фагового дисплея привело к выявлению одинаковых пептидов, критичных для связывания с МКА 58.2 [79].

Эпитопное картирование с помощью фагового дисплея также проводилось для **моноклонального антитела 19b**, выделенного из сыворотки ВИЧ-1-инфицированного нон-прогрессора. Отобранные фаги имели общий мотив **xxIx₃PGRIFYTT**, соответствующий последовательности V3 петли (KRINIGPGRIFYTT) [78]. Изучение связывания МКА 19b с вирусными изолятами, имеющими различные мутации в этой последовательности, показало, что не все остатки в пределах данного мотива имеют решающее значение для связывания [113]. Проведение процедуры биопэннинга с использованием 15-ти мерной библиотеки позволило выявить мотив, не противоречащий последовательности минимально возможного сайта связывания (-I----

G-FY-T), который был определен путем выравнивания последовательностей gp120 из различных субтипов ВИЧ-1 (от А до F), узнаваемых МКА 19b.

Объединенные данные по фаговому дисплею и анализу связывания показали, что эпитоп, узнаваемый bnAb 19b, охватывает обе стороны V3 петли. При этом допускаются замены аминокислотных остатков, расположенных в центре петли, при условии, что это не нарушит структуру β -складки, образованной GPGR мотивом. Тем не менее, Boots с сотрудниками обнаружили единственное исключение, показав, что для формирования 19b-эпитопа замена Phe на Trp может быть допущена без образования β -складки [26].

В 1993 году Мустер с соавторами опубликовали данные о выделении **нейтрализующих антител широкого спектра действия 2F5**. Ими впервые был локализован консервативный эпитоп, узнаваемый bnAb 2F5, на эктодомене белка gp41 ВИЧ-1, с помощью стандартного метода картирования эпитопов. Перекрывающиеся фрагменты эктодомена гликопротеина gp41 были клонированы в виде пептидов, слитых с глутатион-S-трансферазой. Далее среди полученных химерных конструкций выявляли те, которые были способны специфически реагировать с МКА 2F5 в иммуноблоттинге. Полученные Мустером данные дали основания полагать, что аминокислотная последовательность **ELDKWA** является эпитопом, узнаваемым МКА 2F5 на эктодомене белка gp41 ВИЧ-1 [117].

Впоследствии Конли с сотрудниками получили **имитаторы данного эпитопа с помощью процедуры биопэннинга 6-мерной фаговой пептидной библиотеки** с использованием иммобилизованных МКА 2F5. Были получены четыре группы различных последовательностей, имеющие консенсусные мотивы: DKW, LDxW, ED(K/R)W и ELDKW, тем самым подтвердив ранее полученные данные [37].

Однако при иммунизации лабораторных животных пептидами ELDKWA не удалось получить 2F5-подобные антитела. Впоследствии было сделано предположение, что для иммуногенности данному эпитопу требуются дополнительные аминокислотные остатки.

Позднее Менендес с соавторами провели скрининг панели 17-мерной фаговой пептидной линейной библиотеки с использованием МКА 2F5 и сделали вывод, что остатки, фланкирующие регион **DKW** на С-концевой части пептида, сильно влияют на связывание с МКА [107]. Впоследствии они сконструировали вторичные пептидные библиотеки, в которых фаговые частицы экспонировали 12-мерные случайные

аминокислотные остатки, окружающие DKW область (x_{12} -AADKW и AADKW- x_{12}), и с обеими провели процедуру биопэннинга. В результате из библиотеки AADKW- x_{12} было отобрано три пептида, которые с высокой аффинностью связывались с МКА 2F5. Было показано, что количество Ala остатков влияет на механизмы связывания с антителами. Эти данные позволили авторам предположить, что паратоп 2F5 состоит из двух связывающих доменов, которые со строгой специфичностью распознают коровый мотив DKW и мультиспецифично связываются с остатками, расположенными на С-конце пептида.

Независимо от перечисленных выше исследователей, Туманова с соавторами провела биопэннинг 15-мерных фаговых библиотек с целью получения пептидов-имитаторов эпитопа, узнаваемого МКА 2F5 [7, 9]. Было показано, что все отобранные пептиды отличаются в различной степени по аминокислотной последовательности от природного 2F5-эпитопа (A/ELDKWA/G/N), но сохраняют способность эффективно связываться с исследуемым антителом. Туманова исследовала иммуногенные свойства пептидов-имитаторов 2F5-эпитопа (RDWSFDRWSLSEFWL, GRSFLDRWSKVPRDP, YFCYANCDKWVLKGD, RNVPPIFNDVYWIAF), представленных в составе нитчатых бактериофагов, и показала, что сыворотки кроликов и мышей, иммунизированных вышеперечисленными бактериофагами, обладали вируснейтрализующей активностью *in vitro* [7, 8].

После того, как были успешно **идентифицированы линейные эпитопы** [37, 83, 113], Бутц с соавторами предложил расширить использование технологии фагового дисплея для **идентификации конформационных эпитопов вируснейтрализующих антител** [26].

Среди работ по данному направлению исследований стоит отметить попытку **картирования конформационного эпитопа, узнаваемого bnAb 2G12**. Эти антитела обладают нейтрализующей активностью против широкого спектра изолятов ВИЧ-1 различных субтипов, активируют систему комплемента по классическому пути и вызывают антителозависимую клеточную цитотоксичность.

Характерной особенностью эпитопа 2G12 является наличие большого количества маннозных олигосахаридов в его структуре [137, 141]. С целью получить пептидные иммуногены, способные индуцировать выработку 2G12-подобных антител, Менендес с соавторами провели скрининг библиотек с использованием 2G12 и получили фаготоп,

названный 2G12.1, который с высокой аффинностью связывался с 2G12 [108]. Было проведено сравнение кристаллизованного МКА 2G12 в комплексе с синтетическим пептидом 2G12.1 со структурой 2G12-маннозного эпитопа. В результате обнаружилось, что взаимодействие с данными антителами было различным в случае нативного эпитопа и отобранного пептида. Эти результаты демонстрируют, что пептид, полученный с помощью фагового дисплея, не является структурным имитатором 2G12-олигоманнозного эпитопа. В опытах по иммунизации кроликов 2G12.1 фаготоп индуцировал образование высокого титра пептид-специфических антител, однако они не проявляли кросс-реактивности в отношении различных вариантов gp120 [108].

Позднее Туманова с соавторами также провела аффинную селекцию с использованием МКА 2G12 и 15-мерной фаговой библиотеки [7]. Анализ сходства аминокислотных последовательностей отобранных пептидов с последовательностью gp120 (использовались данные рентгеноструктурного анализа, взятые из литературных источников) показал, что общие структурные мотивы селектированных пептидов находятся в районе 380 – 420 аминокислотных остатков gp120 ВИЧ-1. Был сделан вывод, что аминокислотные остатки Phe-383, Tyr-384, Ser-387, Ser-393, Thr-394, Trp-395, Leu-416, Arg-419, Leu-420, по-видимому, определяют связывание bnAb 2G12 с гликопротеином gp120. Данные аминокислоты удалены друг от друга в последовательности, но сближены в пространстве и формируют на поверхности gp120 эпитоп, узнаваемый исследуемым моноклональным антителом. Также была выявлена значимость гликозилирования остатков аспарагина в положениях 295, 332 и 392 для формирования исследуемого эпитопа. На основании выравнивания аминокислотных последовательностей белка gp120 из изолятов и штаммов ВИЧ-1, чувствительных и устойчивых к нейтрализации МКА 2G12, Туманова с соавторами показала, что предсказанные а.о., являются достаточно консервативными у изолятов, нейтрализуемых этим антителом [8].

1.5.3.3. Исследование поликлональных антител, направленных против вирусных эпитопов

Первая попытка с помощью фагового дисплея идентифицировать эпитопы, распознаваемые ВИЧ-специфическими антителами, была выполнена в 1999 году путем

проведения биоэнаннинга против поликлональных фракций IgG, выделенных из плазмы крови двух нон-прогрессоров. Использование линейной и кольцевой 9-мерных библиотек позволило Скала с соавторами получить линейные мимотопы иммунодоминантной области (ID) GKLIC гликопротеина gp41, а также областей V1 и C2 gp120 [140]. Данные мимотопы были иммуногенными при введении мышам и вызвали наработку нейтрализующих антител против ВИЧ-1. Более того, в последующем исследовании было показано, что иммунизация обезьян полученными мимотопами значительно уменьшала вирусную нагрузку [34]. В том же году аналогичное исследование, проведенное с 12-мерной кольцевой библиотекой на антителах, полученных от нон-прогрессора, позволило получить мимотопы, которые соответствовали gp41-ID эпитопу CSGKLIC. Специфичность и кросс-реактивность фаготопов дополнительно оценивали с помощью ВИЧ-положительной панели сывороток [49].

В дальнейшем Паласиос-Родригес с соавторами провели оценку влияния проведения высокоэффективной антиретровирусной терапии на спектр пептидов-имитаторов ID эпитопа CSGKLIC, отбираемых в процессе аффинной селекции [121]. В данном исследовании проводили скрининг смеси линейной 12-мерной, а также линейной и кольцевой 7-мерной библиотек с использованием различных образцов сыворотки от четырех ВИЧ-1-инфицированных пациентов, которые имели различные титры анти-GKLIC антител при назначении антиретровирусной терапии. В итоге среди пептидов из 12-мерной линейной библиотеки был обнаружен консенсусный мотив SxxKxxC, при этом процент возникновения данного мотива по отношению к общему количеству секвенированных образцов был пропорционален титру анти-GKLIC антител для каждого образца сыворотки. Это указывало на то, что именно анти-GKLIC антитела участвуют в отборе консенсусного мотива. Эксперименты по иммунизации мышей двумя мимотопами, наиболее сходными с нативным ID эпитопом gp41, а также элюированным пулом бактериофагов, показали, что все фаги являются иммуногенными, а иммунизация фаговым пулом индуцировала самый сильный противовирусный ответ. Эти результаты указывают на различные иммуногенные свойства мимотопов и на возможность успешной иммунизации животных разнообразными мимотопами.

В 2007 году Хамберт с соавторами исследовали иммунный ответ восьми нонпрогрессоров, в сыворотках которых обнаружили нейтрализующие антитела

широкого спектра действия. С помощью линейных и кольцевых библиотек они определили эпитопы, узнающие IgG сывороток [75]. Каждый раунд аффинной селекции состоял из положительной селекции, осуществляемой с помощью IgG нон-прогрессоров, следуемой за негативной селекцией на IgG здоровых доноров. Как сообщалось в предыдущих исследованиях, некоторые последовательности отобраны на иммунодоминантные регионы, такие как V3 петля на gp120 и GKLIC область gp41 [49, 121, 140]. В дальнейшем были обнаружены линейные мотивы, которые были гомологичны областям, расположенным вблизи V3 петли (NNNT) и ниже области ID gp41 GKLIC (мотив AVPW). Кроме того, были идентифицированы пептиды, перекрывающиеся с мотивом PPWx3W, который входит в состав 2F5-эпитопа. Дополнительно авторы использовали методы компьютерного моделирования для сравнения полученных с помощью фагового дисплея аминокислотных последовательностей с белковыми последовательностями ВИЧ-1, взятых из базы данных белковых структур RCSB [19, 130, 145]. Пулы бактериофагов, соответствующие линейной V3 петле, GKLIC домену и мотиву WxxxW, а также фаготопы, имитирующие конформационные детерминанты, были выбраны для иммунизации мышей с последующим анализом нейтрализующей активности наработанных антител в отношении первичных изолятов ВИЧ-1. Наибольшая нейтрализующая активность была зафиксирована у мышей, иммунизированных мимотопами V3 петли, а иммунизация имитаторами конформационных эпитопов индуцировала слабый нейтрализующий ответ.

Аналогичный подход был использован теми же авторами на макаках-резусах, инфицированных химерным вирусом иммунодефицита SHIV, в котором закодированы оболочечные белки субтипа С ВИЧ-1 (SHIV1157ip). Сыворотка инфицированных обезьян обладала широким нейтрализующим ответом против гомологичных SHIV-С а также гетерологичных ВИЧ-1 штаммов различных субтипов [153]. В результате биопэннинга с использованием данной сыворотки отобранные фаготопы имитировали V2 и V3 петли, С-концевой домен на gp120 или участки на gp41 (ID GKLIC область, другие ID участки и MPER) [74]. Остальные клоны не выявили существенной гомологии с линейной последовательностью ВИЧ-1 и были проанализированы с помощью программного обеспечения 3DEX, что позволило выявить мимотопы с дискретной структурой, расположенные рядом с центральной частью V3 петли. Была выделена

фракция антител, связывающиеся с этими фаготопами, последующий анализ показал, что взаимодействие антитела-фаготопы является конформационно зависимым.

Далее мышей иммунизировали векторной ДНК SHIV1157ip, кодирующей гликопротеин gp160, и бустировали пулом фаговых частиц, несущих имитаторы эпитопов V3 петли, С-конца gp120, ID области gp41, GKLIC региона и области MPER. Почти у всех мышей выявлялись анти-ENV антитела, а 59 % из них обладали нейтрализующей активностью.

В 2009 году Дилтженс с соавторами применили технологию фагового дисплея для поиска эпитопов, узнаваемых антителами, выделенными из сыворотки пациентов, инфицированных CRF02AG-штаммом (ITM4) [42]. Биопэннинг 12-мерной библиотеки с использованием образцов сыворотки от ITM4 пациентов позволил выявить различные пептидные последовательности. Половина из них была гомологична линейным эпитопам на gp41, то есть 4E10-эпитопу в районе MPER (NWFNLTQTLMPR) или пептидам с общим мотивом SLxxLRL, в то время как другие пептиды явились гомологичными С1 домену (KxWWxA) и центральной части V3 петли (Kx3IGPHxxY) на gp120.

В более позднем исследовании эта же группа ученых сконструировала ландшафтную антительную библиотеку на основе bnAbs из сыворотки человека, инфицированного ВИЧ-1 субтипом А, и провела ее скрининг против набора сывороток, полученных в период с 1994 по 2005 год [43]. В результате проведения биопэннинга были получены V2 петли (Kx3Hx3Y), V3 петли (KxxHxGPx3F) и ID области gp41 (CxGxLxCTxNxP) [43]. Реактивность антител по отношению к ID области gp41 колебалась незначительно во всех образцах плазмы. Процент фаготопов, имитирующих V3 петлю, снизился с течением времени. Напротив, фаготопы V2 петли были найдены только в сыворотке 2001 года, а титр соответствующих антител сохранялся до 2005 года. Анализ последовательностей env белков в образцах показал, что появление замены Tyr-His в последовательности V2 петли коррелирует с возникновением антительного ответа к этому участку. Кроме того, авторы подчеркивают, что нейтрализующая активность сывороток частично объясняется присутствием в них антител, распознающими V3 петлю.

Заключение к литературному обзору

СПИД был впервые описан в 1981 году [66], а два года спустя был выделен его этиологический агент – ВИЧ-1 [13]. Борьба с таким сложным объектом как ВИЧ потребовала привлечения новых методов молекулярной биологии и иммунологии. Один из них – технология фагового дисплея – впервые описана в 1985 году [150], т.е. почти одновременно с открытием ВИЧ. В 1991 г. научная группа под руководством Денниса Бертона с помощью фагового дисплея сделала весьма важное открытие – было получено антитело b12, способное нейтрализовать широкий спектр первичных изолятов ВИЧ-1 [31]. В дальнейшем эта техника широко использовалась для изучения структурных особенностей белков ВИЧ-1, их антигенной структуры, картирования эпитопов, узнаваемых нейтрализующими антителами широкого спектра, и получению пептидов-имитаторов антигенных детерминант вируса. На наш взгляд, именно последнее из перечисленных приложений фагового дисплея наиболее важно, поскольку пептиды-миметики могут стать главной составляющей вакцины против ВИЧ-1, направленной на стимуляцию протективного гуморального иммунного ответа. Очевидно, для того, чтобы иммуноген был способен индуцировать протективный иммунный ответ, он должен включать широкий спектр пептидов-имитаторов, узнаваемых bNAbs. Работы в этом направлении являются актуальными.

Данная работа будет посвящена поиску имитаторов эпитопов, узнаваемых bNAbs b12, Z13 и VRC01 с использованием фаговых пептидных библиотек.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы

Название реактива	Фирма-изготовитель, страна
Агар	Difco, США
Агароза	Bio-Rad, США
Азид натрия (NaN_3)	ICN Biomedicals, США
Акриламид	Sigma, США
Бычий сывороточный альбумин (БСА)	Sigma, США
Бактотриптон	Difco, США
Бромфеноловый синий	Sigma-Aldrich, США
Глицин	Bio-Rad, США
Глицерин	Sigma, США
Диметилформамид (DMF)	Sigma-Aldrich, США
Диметилсульфоксид (DMSO)	Sigma-Aldrich, США
Дрожжевой экстракт	Difco, США
Йодид натрия	Amresco, США
Конъюгат антител кролика против человека со щелочной фосфатазой	Sigma, США
Конъюгат антител кролика против мыши со щелочной фосфатазой	Sigma, США
Ксиленицианол	Sigma-Aldrich, США
N,N-метиленбисакриламид	Sigma, США
Мочевина	ICN Pharmaceuticals, США
Пептон казеиновый	Fluka, Швейцария
Персульфат аммония	Thermo Scientific, США
Полиэтиленгликоль 8000 (ПЭГ-8000)	Amresco, США
Полный агар	Difco, США
N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД)	Thermo Scientific, США
Твин-20 (Tween-20)	ICN Biomedicals, США
Трис(гидроксиметил)аминометан (Трис)	Amresco, США
Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)	Amresco, США
Изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ)	Thermo Scientific, США
5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид (XGal)	Thermo Scientific, США
5-бром-4-хлор-3-индолил-фосфат (BCIP)	Thermo Scientific, США
Нитротетразолиевый синий (NBT)	Thermo Scientific, США

2.1.2. Пептиды, бактериальные штаммы, моноклональные антитела

Пептидные последовательности были синтезированы компанией GenScript (США), без введения N- и C-концевых модификаций. Уровень чистоты пептидов составлял не менее 80 %.

Штамм *Escherichia coli*: ER2738 (*F'**proA*+*B*+ *lacIq* Δ (*lacZ*)*M15* *zzf::Tn10*(*TetR*)/*fhuA2* *glnV* Δ (*lac-proAB*) *thi-1* Δ (*hsdS-mcrB*).

Моноклональные антитела человека VRC01, Z13e1 и IgG1b12 были получены от организации NIH (США) при проведении научно-исследовательских работ в рамках программы NIH AIDS Research and Reference Reagent Program.

2.1.3. Культуральные среды

Среда LB. На 1 л: Бактотриптон –10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 10 г. pH 7.2.

Нижний агар. На 1 л: полный агар – 22,5 г, NaCl – 10 г, pH 7.2 – 7.4.

2.1.4. Магнитные частицы

Использовались магнитные частицы, конъюгированные с белками А или G, производства ЗАО Силекс (Россия).

2.1.5. Фаговые пептидные библиотеки

В работе использовались коммерческие фаговые библиотеки Ph.D.-12, Ph.D.-7, Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library Kit производства New England Biolabs (США). В наборах Ph.D.-7 и Ph.D.-12 бактериофаги несут случайные пептидные фрагменты длиной 7 и 12 аминокислотных остатков соответственно, кодируемые в одной рамке считывания с минорным белком оболочки рIII фага M13. В библиотеке Ph.D.-C7C рандомизированный пептидный фрагмент фланкирован по обоим концам цистеинами, в результате чего экспонируется на поверхности белка рIII в виде петли. Рандомизированные пептиды находятся на N-конце молекулы оболочечного белка рIII и, соответственно, представлены в пяти копиях на каждый вирион. Библиотеки

содержат приблизительно 2×10^9 индивидуальных фаговых клонов. Концентрация физических частиц – 2×10^{13} вирионов/мл.

2.1.6. Плазмиды, несущие гены ВИЧ-1

Перечисленные ниже материалы были получены при проведении научно-исследовательских работ в рамках программы NIH AIDS Reagent Program.

Плаزمида pSG3^{Δenv}, созданная на базе pTZ19U, несет полный геном вируса ВИЧ-1, за исключением гена env.

Плазмиды, несущие недостающую для получения псевдовирuсов кассету env/rev в составе pcDNA3.1/V5, были любезно предоставлены Мигелем Томсоном из Национального центра микробиологии, Instituto de Salud Carlos III, и представлены следующими клонами:

QH0692.42, субтип В; входит в состав стандартной панели референсных штаммов ВИЧ-1 и относится к группе псевдовирuсов, обладающих умеренной устойчивостью к нейтрализующему действию антител (tier 2)

PVO.4, субтип В; входит в состав стандартной панели референсных штаммов ВИЧ-1 и относится к группе псевдовирuсов, обладающих высокой устойчивостью к нейтрализующему действию антител (tier 3)

RHRA4259.7, субтип В; входит в состав стандартной панели референсных штаммов ВИЧ-1 и относится к группе псевдовирuсов, обладающих умеренной устойчивостью к нейтрализующему действию антител (tier 2)

RUA_007_e3_1, субтип А

RU_915_1080_A4_4, субтип А

RU915_1007_A9_3, субтип А

20059_5, субтип AG

20066_7, субтип AG

RUA_003aT8_2, субтип AG

2.1.7. Растворы

Азид натрия (NaN₃, 5 % раствор): на 950 мкл воды – 50 мг NaN₃

Блокирующий раствор: 0,1 М NaHCO_3 , 5 % (5 мг/мл) БСА, 0,1 мкг/мл стрептавидина, 0,02 % NaN_3

ПЭГ/NaCl (16,7 %/3,3 М), На 475 мл H_2O : ПЭГ 8000 – 100 г, NaCl – 116,9 г

ТЕ: 10 mM трис-HCl, pH 8,0; 1 mM ЭДТА

ТВЕ: 0,089 М трис-борат pH 9,0, 0,089 М борная кислота

ТСБ: 0,05 М трис HCl pH 7,5; 0,15 М NaCl

ТСБ-Т: 0,05 М трис HCl pH 7,5; 0,15 М NaCl, Твин-20 (v/v 200 : 1)

ФСБ: 0,002 М KH_2PO_4 , 0,01 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,137 М NaCl, 0,0027 М KCl, pH довести NaOH до 7,4

ФСБ-Т: 0,05 %-ный Твин-20 в буфере ФСБ

Элюирующий буфер (четырёхкратный): 0,1 М HCl, pH довести до 2,2 глицином, 1 % (1 мг/мл) БСА

2.2. Методы

2.2.1. Аффинная селекция

Аффинную селекцию пептидов, специфично взаимодействующих с bnAbs Z13e1, VRC01 и IgG1b12, проводили по схеме, описанной в руководстве New England Biolabs. Использовалось два варианта сорбции антител на подложку.

Первый подразумевал прямую иммобилизацию антител на пластик иммунологических планшетов. В этом случае для проведения первого и второго раундов селекции в лунки иммунологических планшетов вносили по 100 мкл раствора МКА в концентрации 10 мкг/мл в 50 mM NaHCO_3 pH 9,3; сорбцию продолжали в течение ночи при 4°С (использовали десять лунок для первого раунда и шесть лунок для второго раунда). После этого лунки 6 раз промывали ТСБ-Т. Для подавления неспецифического связывания (блокировка) в лунки добавляли 1 %-ный раствор БСА в ТСБ, содержащем 0,5 %-ный Твин-20, и инкубировали в течение 1,5 ч при 37°С. Затем в лунки добавляли по 5×10^{11} вирионов из фаговых пептидных библиотек, растворенных в ТСБ (1-ый раунд), или амплифицированный элюат раунда 1 (в случае проведения второго раунда), и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Несвязавшиеся фаги удаляли путем десятикратной промывки ТСБ-Т, специфически связанные с антителами фаговые частицы элюировали, после чего амплифицировали путем инкубации в присутствии

культуры клеток ER2738 в течение 5 ч при 37° С. Описанную процедуру повторяли два раза (2-й и 3-й раунды). Отобранные после 3-го раунда фаговые клоны рассеивали на чашки с агаризованной средой. Полученные бляшки отбирали микробиологической петлей и нарабатывали в препаративном количестве.

Во втором случае смесь антитела-бактериофаги сорбировали последовательно на магнитные частицы, покрытые белком А или белком G, согласно очередному раунду селекции. 50 мкл суспензии магнитных частиц промывали 1 мл ТСБ-Т и инкубировали в 1 мл блокирующего буфера в течение 1 ч при 4° С. Далее суспензию промывали ТСБ-Т, осаждали на дне пробирки и инкубировали с 200 мкл смеси, содержащей 2×10^{11} вирионов из библиотеки и 1,5 мкг МКА, в течение 20 мин при комнатной температуре. После инкубации с антителами процедуру отмывки и осаждения повторяли 10 раз, затем элюировали связавшиеся фаговые частицы. К осадку добавляли элюирующий буфер (Глицин-HCl), инкубировали 10 мин. Супернатант переносили в новую пробирку и нейтрализовали 150 мкл 1 М трис-HCl, pH 9,1. Элюат титровали, амплифицировали и использовали для следующих раундов аффинной селекции. Для уменьшения количества неспецифически связывающихся фаговых клонов ("Plastic binders", или "PB-клоны") в элюате после второго раунда проводили процедуру негативной селекции. Для этого перед стадией аффинной селекции элюат второго раунда инкубировали с суспензией магнитных частиц без добавления МКА. Супернатант после негативной селекции использовали для проведения 3-го раунда по описанной ранее схеме с добавлением антител.

2.2.2. Выявление последовательностей рандомизированных вставок, экспонированных на фагах, неспецифично связывающихся с полистирольными планшетами

Отбор бактериофагов, неспецифически взаимодействующих с подложкой, проводился по описанной выше схеме, с одним исключением: после блокировки БСА моноклональные антитела не добавлялись в лунки планшетов. После проведения трех раундов аффинной селекции отобранные фаговые клоны нарабатывались в количестве, их ДНК в области рандомизированной вставки секвенировалась, после чего определялись аминокислотные последовательности пептидов, неспецифически связывающихся с пластиком иммунологических планшетов.

2.2.3. Титрование фагов с использованием клеток E. coli ER2738

Культуру клеток подращивали до оптической плотности 0,5. Аликвоты объемом 10 мкл последовательных разведений фаговых суспензий вносили в 200 мкл культуры ER2738 (OD=0,5). Далее культуру переносили в пробирки, содержащие 3 мл верхнего агара (при 45° С). После перемешивания на шейкере верхний агар с внесенными суспензиями бактериофагов разливался на предварительно прогретые при 37° С чашки Петри с нижним агаром, содержащим Xgal/IPTG, и инкубировали ночь при 37° С. Титр фагов определяли по числу бляшек, имеющих голубую окраску, в пересчете на количество фаговых частиц, использовавшихся при проведении аффинной селекции.

2.2.4. Выделение и наработка индивидуальных фаговых клонов

Единичную колонию переносили в 5 мл среды LB, содержащей тетрациклин (20 мкг/мл), добавляли 50 мкл ночной культуры ER2738 и инкубировали на термостатированной качалке при 37° С в течение 5 ч. Клетки осаждали центрифугированием при комнатной температуре в настольной центрифуге при 14000 об/мин, 30 с. Супернатант аккуратно переносили в новую пробирку и повторно центрифугировали. Супернатант переносили в новые пробирки. Полученные образцы хранили при 4° С и использовали для проведения дот блот анализа. В случае длительного хранения амплифицированных фаговых клонов к суспензии добавляли глицерин в соотношении 1:1 и хранили при -20° С.

2.2.5. Выделение фаговой ДНК

Единичную бляшку переносили в 5 мл среды LB, содержащей тетрациклин (20 мкг/мл), добавляли 50 мкл ночной культуры ER2738 и инкубировали на термостатированной качалке при 37° С в течение 5 ч. Клетки осаждали центрифугированием при комнатной температуре в настольной центрифуге при 14000 об/мин, 30 с. Фаговый осадок растворяли в 100 мкл 4 М NaI. К раствору добавляли 2,5 объема этанола, перемешивали и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. ДНК осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 14000 об/мин,

осадок промывали 500 мкл 70 % этанола, просушивали и растворяли в 50 мкл стерильной воды. Очищенную этим методом ДНК использовали в качестве матрицы для определения нуклеотидной последовательности методом Сэнгера.

2.2.6. Дот блот анализ

Суспензию бактериофагов наносили на нитроцеллюлозную мембрану в количестве 5×10^{10} , 1×10^{10} и $0,2 \times 10^{10}$ бое (в 2 мкл PBS). После высыхания мембрану блокировали 3 %-ным БСА 1 ч при комнатной температуре, затем инкубировали в течение 2 ч при 37° С с раствором первичных антител в концентрации 1 мкг/мл. Отмывку несвязавшихся антител производили 3 раза по 10 мин ФСБ-Т. В качестве вторичных были использованы антитела козы против IgG человека (Thermo Scientific Pierce Antibodies, США), конъюгированные со щелочной фосфатазой. Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали с конъюгатом, разведенным в 5000 раз в блокирующем буфере в течение 1 ч. Несвязавшиеся компоненты отмывали 3 раза по 10 мин ФСБ-Т. В качестве хромогенного субстрата использовали смесь BCIP и NBT.

2.2.7. Вестерн-блот анализ

Для детекции вирус-специфических антител использовались полоски нитроцеллюлозы, на которые после электрофореза в SDS PAAG были перенесены белки ВИЧ-1 (NewLavBlot1). Сыворотки животных разводили в 50 раз в ТБС-Т и инкубировали со стрипами в течение двух часов при покачивании. Далее полоски трижды отмывали ТБС-Т по 5 мин, после чего добавляли конъюгат антител кролика против мыши с щелочной фосфатазой в титре 1:5000, инкубировали в течение 1 ч при покачивании. После отмывки вносили проявляющий реагент BCIP/NBT. В качестве положительного контроля брали ВИЧ-позитивную человеческую сыворотку, а в качестве отрицательного – сыворотку мышей, иммунизированных бактериофагами без встройки. После проявления нитроцеллюлозных стрипов в течение 20 мин наблюдали окрашенные полосы, по электрофоретической подвижности соответствующие определенным вирусным белкам.

2.2.8. Компьютерный анализ

Для определения соответствия между отобранными последовательностями пептидов и антигеном gp120 использовались сервер Pepitope [104] и программное обеспечение pdMap, разработанное в Теоретическом отделе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Бакулиной А.Ю. Сервер Pepitope предназначен для определения неизвестных эпитопов, узнаваемых антителами, с использованием результатов фагового дисплея, и позволяет выявлять, в том числе, и нелинейные эпитопы. На сервере проводится поиск соответствия между парами пространственно сближенных аминокислотных остатков на поверхности антигена и парами остатков в последовательностях пептидов. Затем объединяются пары на поверхности антигена, расстояние между которыми не превышает максимально возможное между аналогичными парами в пептиде. Программа pdMap, написанная на языке python с использованием библиотеки BioPython, реализует аналогичный метод, но вместо пар аминокислотных остатков используются отдельные остатки, а район поиска эпитопа на антигене задается пользователем.

2.2.9. Получение антисывороток к бактериофагам

Кроликов иммунизировали очищенными препаратами бактериофагов (0,4 мг на кролика), экспонирующих пептиды, которые продемонстрировали способность подавлять нейтрализующую активность антител. Первую инъекцию проводили подкожно, в четыре точки вдоль спинного хребта, в смеси с полным адъювантом Фрейнда, последующие четыре – с интервалом в две недели в смеси неполным адъювантом. Контрольной группе кроликов вводили бактериофаг M13 дикого типа по аналогичной схеме. Забор крови проводили из краевой ушной вены через неделю после последней иммунизации. Наличие в сыворотках пептид-специфических антител определяли в реакции вируснейтрализации.

Мышей линии BALB/c иммунизировали очищенными препаратами бактериофагов (2×10^{12} фаговых частиц/мышь) внутрибрюшинно в три приема с 3-недельным интервалом. Контрольной группе вводили бактериофаг M13 дикого типа по аналогичной схеме [58]. За основу схемы иммунизации была взята методика Фольгори с соавторами, данная методика не предусматривает использование адъювантов [58].

Сыворотку от иммунизированных животных получали через неделю после последней иммунизации.

2.2.10. Получение Env-псевдотипированных вирусов

Псевдовirusы получали котрансфекцией клеток 293T/17 плазмидами pcDNA3.1/V5, несущими различные полноразмерные гены gp160, и плазмидой pSG3Δenv, несущей все остальные гены ВИЧ-1, за исключением gp160. Процедуру проводили с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen): на 5 мкл липофектамина 2000 брали по 300 нг плазмид pEnv и pSG3Δenv. Смесь тщательно перемешивали, инкубировали 15 мин при комнатной температуре и переносили в 24-луночный планшет к монослою клеток 293T/17. Через 48 ч инкубации в CO₂-термостате при 37° С отбирали культуральную среду. От клеток псевдовirusы отделяли путем низкоскоростного центрифугирования с последующей фильтрацией через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Полученную псевдовirus-содержащую надосадочную жидкость хранили при -80° С в среде DMEM, содержащей 20 % фетальной бычьей сыворотки.

2.2.11. Определение цитопатической дозы 50 % псевдовirusов

Титр псевдовirusа определяли методом полных кумулятивов [132] и выражали в TCID₅₀/мл. Для этого в каждую лунку 96-луночного культурального планшета помещали по 100 мкл ростовой среды DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. В первые лунки помещали по 25 мкл стока псевдовirusов, и проводилось серийное 5-кратное разведение в 3-х повторах. В каждую лунку добавляли по 100 мкл свежих трипсинизированных клеток TZM-bl в концентрации 1×10^5 клеток/мл в ростовой среде DMEM. Предварительно к клеткам добавляли декстран из расчета 30 мкг/мл. Смесь инкубировали 48 ч в CO₂-инкубаторе при 37° С. Уровень TCID₅₀ определяли путем измерения люциферазной активности в клетках TZM-bl.

2.2.12. Реакция вируснейтрализации

Реакция вируснейтрализации проводилась в двух вариантах:

- конкурентный анализ пептидов-имитаторов;
- оценка вируснейтрализующей активности антисывороток.

Вируснейтрализация с **пептидами**-конкурентами проводилась по схеме, описанной в работе Брунеля с соавторами [27]. Клетки линии 293Т трансфицировали плазмидой pNL4-3-gfp, через 48 ч производился сбор способных к репликации вирусных частиц. В 96-луночные планшеты вносились последовательные разведения исследуемых пептидов и добавлялись соответствующие МКА. Смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре, после чего переносили в планшет, содержащий рабочие дозы ВИЧ-1 штамма NL4-3. По истечении 1 ч при комнатной температуре содержимое лунок смешивали с чувствительными к заражению ВИЧ-1 клетками линии TZM-bl и инкубировали двое суток при 37° С. Клетки линии TZM-bl содержат репортерный ген люциферазы под контролем промотора, активного в присутствии белка ТАТ ВИЧ-1. После удаления среды лунки промывали ФСБ, добавляли по 25 мкл лизирующего буфера (Luciferase Cell Culture Lysis Buffer) и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. 20 мкл лизата из каждой лунки переносили в планшеты OptiPlate и добавляли по 50 мкл Luciferase assay реагента. Уровень люминесценции измеряли с помощью люминометра Wallac 1420 Multilabel counter (Perkin Elmer, Waltman, MA) при длине волны 482 нм. В качестве отрицательного контроля использовали смесь вируса и МКА без добавления пептида, в качестве положительного – рабочую дозу вируса без добавления антител и пептидов.

Нейтрализующую активность **антисывороток** определяли в реакции вируснейтрализации с использованием панели псевдотипированных вирусных частиц, полученных на основе штаммов ВИЧ-1 субтипов А, В и AG. Псевдовirusы были получены путем котрансфекции backbone-плазмидой pSG3^{Δenv}, несущей полный геном ВИЧ-1 за исключением гена env, и векторами, кодирующими белки оболочки ВИЧ-1 штаммов из использовавшейся панели (список штаммов представлен в п. 2.1.7). Получение псевдотипированных вирусов подробно описано в п. 2.2.10. Эксперимент проводили согласно протоколу Монтефиори [110]. В лунки планшета, содержащие 150 мкл культуральной среды, вносились последовательные пятикратные разведения

антисывороток (с титрами от 1:40 до 1:625000) объемом 11 мкл. В качестве отрицательного контроля (фоновый люминесцентный сигнал) использовали один ряд лунок, содержащих только среду (без добавления антисывороток). Затем в каждую лунку за исключением контрольного ряда добавляли по 50 мкл суспензий псевдовирусов с концентрацией, соответствующей значению 200 TCID₅₀/100 мкл. Далее во все лунки вносили 100 мкл суспензии клеток TZM-bl с концентрацией 100000 клеток/мл, инкубировали 48 ч при 37° С. После инкубации из лунок отбирали по 150 мкл их содержимого и добавляли реактив для оценки экспрессии гена светлячковой люциферазы в клетках млекопитающих. После лизирования клеток по 150 мкл из каждой лунки переносили в лунки планшета для измерения люминесцентного сигнала. Уровень люминесценции измеряли с помощью люминометра Wallac 1420 Multilabel counter (Perkin Elmer, Waltman, MA) при длине волны 482 нм.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как отмечалось во "Введении", одной из задач исследования являлся отбор пептидов-имитаторов эпитопов, узнаваемых bnAbs Z13e1, VRC01, IgG1b12. Соответственно, данные антитела являются тремя главными инструментами исследования, что подразумевает проведение трех параллельных циклов экспериментальных работ. Все три антитела отличаются друг от друга как по узнаваемым ими антигенным детерминантам, так и по эффективности. Для удобства восприятия полученного материала его изложение будет проводиться в соответствии с выбранными для исследования объектами.

3.1. Поиск пептидов-имитаторов эпитопа ВИЧ-1, узнаваемого нейтрализующим моноклональным антителом Z13e1

3.1.1. Аффинная селекция фаговых библиотек с моноклональным антителом Z13e1 и анализ отобранных фаговых клонов

Для отбора фаговых клонов, специфично связывающихся с МКА Z13e1, проводилось три раунда аффинной селекции. Для этого использовали 2 комбинаторные библиотеки, содержащие встройки пептидных фрагментов длиной 12 и 7 аминокислотных остатков, объединенных с минорным белком оболочки рIII фага M13 (Ph.D-12 и Ph.D-7 соответственно). Степень обогащения популяции фагов специфичными клонами определяли путем титрования элюатов после каждого раунда аффинной селекции. Во всех случаях наблюдалось последовательное увеличение количества элюируемых бактериофагов, что свидетельствовало о насыщении элюатов специфичными клонами (таблица 2).

После третьего раунда увеличения числа фаговых клонов не происходило, что означало достижение предела насыщения популяции фагов специфичными клонами. После проведения третьего раунда аффинной селекции полученную популяцию фагов высевали на агаризованную среду и случайным образом отбирали индивидуальные фаговые клоны. В результате из 12-мерной библиотеки для дальнейшего анализа было взято 40 бактериофагов, из 7-мерной – 45. Обе данные выборки превосходят указанное в

руководстве производителем фаговых библиотек число в 10-20 клонов, которое обычно считается достаточным для определения консенсусного мотива.

Таблица 2

Динамика обогащения фаговых библиотек в процессе аффинной селекции

Библиотека, использовавшаяся в эксперименте	Номер раунда аффинной селекции	Входящий титр	Титр элюата	Выход (%)*	Фактор обогащения**	Число отобранных фаговых клонов
Ph.D-12	I	1×10^{11}	$8,1 \times 10^5$	$8,1 \times 10^{-4}$	1	40
	II	1×10^{11}	5×10^6	5×10^{-3}	6,17	
	III	1×10^{11}	$1,6 \times 10^9$	1,6	320	
Ph.D-7	I	1×10^{11}	$1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-4}$	1	45
	II	1×10^{11}	$4,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^{-3}$	0,1	
	III	1×10^{11}	$2,7 \times 10^9$	2,7	627.9	

*Выход (%) = (кол-во элюированных фагов \times 100 %)/(кол-во вносимых фагов)

**Фактор обогащения вычислялся следующим образом: отношение входящего титра к титру элюированных фагов в первом раунде принимали за условное значение, равное 1. Для последующих раундов вычисляли степень обогащения по отношению к нормализованному значению в первом раунде [173]

3.1.2. Анализ аминокислотных последовательностей отобранных пептидов

Согласно условиям программы NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, количество антител, предоставляемых этим фондом, не превышает 100 мкг. Учитывая ограниченность этих ключевых реагентов, была выбрана схема эксперимента, при которой на первом этапе из отобранных фагов выделялась одноцепочечная ДНК, которая затем секвенировалась в районе встройки рандомизированного олигонуклеотида. По результатам секвенирования определялись последовательности аминокислотных остатков, входящих в состав найденных пептидов. После этого проводился сравнительный анализ выбранных последовательностей для того, чтобы избежать многократного анализа повторяющихся клонов, а также исключить те из них, которые содержат мотивы, обуславливающие неспецифическую сорбцию ("Plastic binders", или "PB-клоны"). Список выявленных в ходе биопэннинга пептидных последовательностей, экспонируемых на поверхности неспецифических PB-клонов, представлен в таблице 3. Из дальнейшего рассмотрения такие клоны исключены.

Таблица 3

Пептидные последовательности, неспецифически связывающиеся с пластиком иммунологических планшетов

Библиотека Ph.D-12	
Экспонируемый пептид	Кол-во отобранных фагов
----VRPDPMYTSKID----	1
ASTNVFARPMYL-----	1
---FHRGHFWPYWHP-----	3
---FHRSHWYQTWVP-----	1
---GHFHHQRHLLTK-----	5
---GHFGYRYHDAWR-----	1
---WHYPRLHSWFTQ-----	2
----HMARNHHMF PQH----	1
-GAMHLPWHMGTL-----	2
---WHRTPQFWAFPW-----	3
---WHRTPLWSYWQY-----	3
---WHWNAWNWSSQQ-----	17
-WHSHWPYWAWSQ-----	1
-----WPYWNWHGWRXX---	1
-----THWWS-WMT PMPY	1
-----WHTHWWK-WHQQP--	1
-----WPHHLWSHWWPP---	5
----YWPSKHWW-WLAP---	7
---WHWPWPRYTSPT-----	2
---WHWPWTIYHSDA-----	1
---WHWF PNHHYHSA-----	2
---WHWPYLHYAHHF-----	1
---SHWSWFYRTVDS-----	1
----HWTSFHKNRWPV----	1
---WHFTWWVDNRMT-----	1
----APPGNWRNYLMP----	1
---WWSPYNARPTLG-----	1
-HHYWWPWQITNS-----	3
HVHKNYPFITTN-----	1
---WHYPSLWRLWGS-----	1
----LDKNQYRSLTQN----	1
---FLQTARWRHTLA-----	1
----HPGLAVPQTHRP----	1
---IAVPTPRADSTA-----	1
----SWHHILFNYLGR----	1
---SYQPYFLQSKQI-----	1
---YFGTPKHMIAKA-----	1

Последовательности пептидов, не вошедших в группу РВ-клонов, были выровнены с помощью программы Clustalw2 с целью идентификации консенсусного мотива (см. таблицу 4).

Таблица 4

Аминокислотные последовательности пептидов, входящих в состав селектированных с использованием МКА Z31e1 бактериофагов

Библиотека Ph.D-12*			Библиотека Ph.D-7		
Номер фага	Экспонируемый пептид	Кол-во отобранных фагов	Номер фага	Экспонируемый пептид	Кол-во отобранных фагов
9	---EWTNWLDITNLA--	4	2	SVSSIAP---	1
3	---GIKNWIDVTGDW--	2	4	HMMSSES---	1
32	--SQSLNWWIDITSP---	1	11	VYPTTPS---	1
37	-TARDYNWIDLTG----	1	5	TNKYLPI---	1
20	----SWNWRDITMLSL-	1	24	-GMYPTLR--	1
25	---FPANWRDITDLA-	2	25	-GTYPHSH--	1
28	--TSWYNWSDITLR--	1	14	-GMLFSLN--	1
30	-SPHAFNWNVDVTT----	1	3	---SHTLNFL	1
39	---TYHNYSDITFAL--	1	7	EWTNWLD---	1
24	--RHHFNYPDITRE---	1	13	GARVLSD---	1
10	--SHTLNFLDLTST	7	42	TTHSSAS---	1
23	--LPMLNFLDLTDL	1	40	FYPNLHA---	1
36	--IPPLNHFDLTRY	1	38	HTASVVI---	1
2	--SSWLDYHDLTNM	1	8	AHLAPRS---	1
1	-WTKDGNLYDITV	4	6	ATHAIHP---	1
7	--YGPLNYIDITDD	1	27	KLPPLRT---	1
6	DANPWFNMVDVT	1	35	-SPPLKMN--	1
19	SHMMDLNNLDLT	1	18	-TPPTIPG--	1
43	--HHNLNVHDLTRL	1	1	LKAATHY---	1
35	--SPRLNNVDITEL	1	39	TSQVISY---	1
40	----NWNTRDITQILK	1	21	QPPHRPV---	1
42	--WINKNLYDITTK	1	26	IHTPDGW---	2
4	GMLFSLNYNDIT	1	16	--DFSGHMH-	1
8	----DLNHHDITSDKY	1	41	-VDLKGHN--	1

*В списке пептидов не указаны последовательности из 12-мерной библиотеки, в которых консенсусный мотив не наблюдается

При сравнении последовательностей 12-мерных пептидов был обнаружен консенсусный мотив вида **NxxDIT**, выделенный цветом. Известно, что МКА Z13e1 узнает линейный фрагмент на поверхности внешнего мембранно-проксимального участка (MPER) белка gp41. Было показано, что самый короткий пептидный фрагмент, с которым связывается МКА Z13e1 наиболее эффективно, имеет структуру WASLWNWFDITN. Методом аланинового сканирования было установлено, что

ключевую роль в связывании Z13e1 с пептидом играют аминокислотные остатки N₆₇₁ и D₆₇₄ [118].

Как можно заметить, в обнаруженном мотиве NxxDIT присутствуют оба этих остатка, также разделенных двумя аминокислотами. Исключением является пептид SSWLDYHDLTNM, в котором вместо аспарагина в консенсусном мотиве присутствует противоположная по заряду аспарагиновая кислота. Тем не менее, как выяснилось в дальнейшем, данный пептид специфически взаимодействует с Z13e1 в дот блоте. По-видимому, замена заряда каким-то образом компенсируется другими остатками, входящими в его состав.

Среди 7-членных пептидов какой-либо общий мотив не выявляется, несмотря на то, что представительность 7- и 12-мерной библиотек не отличалась (~10⁹ индивидуальных фаговых клонов).

3.1.3. Дот блот анализ отобранных фаговых клонов

Специфичность связывания полученных бактериофагов с bnAb Z13e1 подтверждали с помощью дот блот анализа. Данная методика была выбрана по причине ее простоты, возможности быстрой обработки большого массива данных, а также вследствие меньшего по сравнению с ИФА расхода крайне дефицитных моноклональных антител. Поскольку в дальнейшем предполагалась дополнительная проверка клонов в реакции вируснейтрализации, на данном этапе не требовалось производить количественную оценку их антигенных свойств.

В эксперименте анализировались только те клоны, в состав которых входят различные по аминокислотному составу пептиды. Результаты взаимодействия фаговых клонов, отобранных из 12-мерной библиотеки, приведены на рис. 6.

Аналогичная проверка фагов, отобранных из библиотеки Ph.D-7, показала, что среди них отсутствуют клоны, способные специфично связываться с антителом Z13e1. Очевидно, отобранные после трех раундов селекции клоны являются результатом либо слабоаффинного взаимодействия с Z13e1, либо неспецифического отбора на подложку, либо их комбинации. По-видимому, пептидные последовательности длиной 7 а.о. слишком коротки для того, чтобы эффективно связываться с паратопом МКА Z13e1. По этой причине в дальнейших экспериментах данные клоны не анализировались.

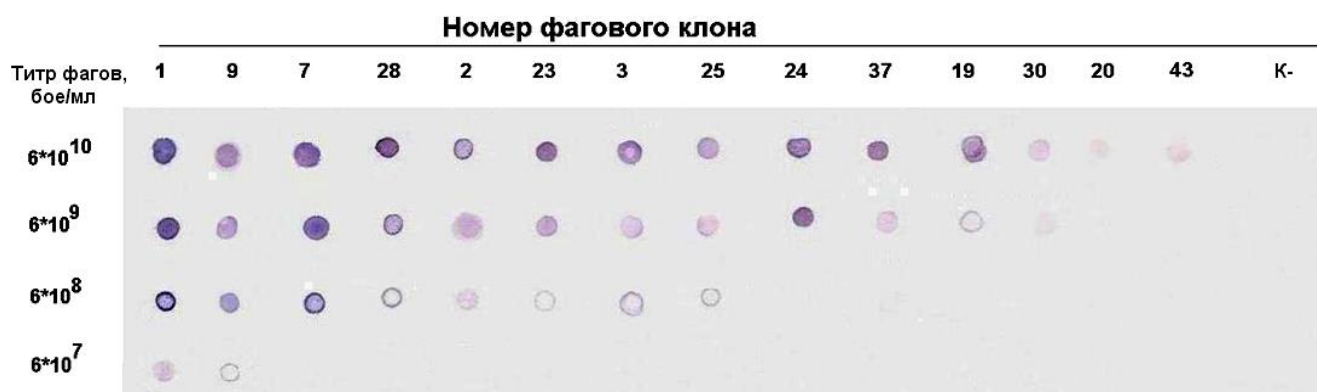


Рис. 6. Дот блот-гибридизация исследуемых фаговых клонов с антителами Z13e1. На нитроцеллюлозную мембрану наносили последовательные десятикратные разведения фаговых частиц. В качестве отрицательного контроля (К-) был использован бактериофаг, не содержащий искусственную пептидную вставку. Титр бактериофагов указан в бое/мл. На рисунке не представлены результаты анализа клонов, для которых специфического взаимодействия с bnAb Z13e1 обнаружено не было

В результате проведения дот блот анализа нами было показано, что среди отобранных из 12-мерной библиотеки фаготов с наибольшей аффинностью с bnAb Z13e1 связываются фаги №№ 1, 7, 9, 3, 23, 2, 28, 25, 37 и 24, экспонирующие, соответственно, пептиды WTKDHNYLDITV, YGPLNYIDITDD, EWTNWLDITNLA, GIKNWIDVTGDW, LPMLNFLDLTDL, SSWLDHNYLDITV, TSWYNWSDITLR, FPANWRDITDLA, TARDYNWIDLTG и RHNFNYTDITRE (рис. 7). Среди них выявляется общий мотив **NW/Y_F/XDI_{L/V}/T**, где X обозначает присутствие в цепи любого а.о., а символы, написанные через наклонную черту, указывают на присутствие в конкретной позиции одного из перечисленных остатков.

Из результатов анализа можно сделать вывод, что выделенный консенсус по ряду ключевых позиций имеет большое структурное сходство с эпитопом gp41, узнаваемым Z13e1. В первую очередь, это N₆₇₁, D₆₇₄ и T₆₇₆. В позиции I₆₇₅ обнаруживаются также L и V. Известно, что обе эти аминокислоты имеют сходные с I алифатические радикалы и относятся к одной и той же группе. Что касается W₆₇₂, то в аналогичной позиции среди отобранных пептидов, кроме остатка триптофана, обнаруживаются фенилаланин или тирозин, радикалы которых также являются ароматическими (см. рис. 7).

gp41	-WASLWNWFDITN
1	-WTKDGNLYLDITV
9	---EWTNWLDITNLA--
7	--YGPLNYIDITDD
28	--TSWYNWSDITLR--
2	--SSWLDYHDLTNM
23	--LPMLNFLDLTDL
3	---GIKNWIDVTGDW--
25	---FPANWRDITDLA-
24	--RHHFNYSITRE---
37	-TARDYNWIDLTG----
19	SHMMDLNNLDLT
30	-SPHAFNWNVDVTT----
20	----SWNWRDITMLSL-
43	--HHNLNVHDLTRL

Рис. 7. Выведенные последовательности пептидов из клонов, отобранных по результатам иммуноблоттинга. Номера фаговых клонов и соответствующие им пептиды, полученные с помощью фагового дисплея и bNab Z13e1, ранжированы сверху-вниз в соответствии с интенсивностью сигнала в дот блоте. Для сравнения приведена аминокислотная последовательность линейного участка на gp41 (666-677 а.о., WASLWNWFDITN), с которым связываются bNabs Z13e1

Таким образом, мы видим явно неслучайное сходство отобранных последовательностей пептидов с эпитопом gp41, которое, однако, не является абсолютным. Этот факт не должен вызывать удивления, поскольку пептид-имитатор по определению не обязан совпадать на 100 % со своим прототипом. В противном случае исчезнет смысл в их поиске.

3.1.4. Иммуногенные свойства отобранных пептидов в составе бактериофагов

Бактериофагами, продемонстрировавшими максимальные сигналы в дот блот анализе, были иммунизированы лабораторные животные. Двум кроликам подкожно вводились смеси суспензий образцов фага № 1, несущего на своей поверхности пептид WTKDGNLYLDITV, и № 9 (экспонирует пептид EWTNWLDITNLA). Контрольную группу иммунизировали бактериофагом M13, не содержащим пептидной вставки. Пептиды из выбранных фаговых клонов гомологичны эпитопу, узнаваемому МКА Z13e1, по пяти и шести а.о., соответственно, что является максимальным значением среди всех идентифицированных последовательностей.

Вируснейтрализующую активность полученных антисывороток определяли с использованием псевдовирусов. Env-псевдотипированные вирусные частицы получали путем котрансфекции backbone-плазмиды, содержащей полный геном ВИЧ-1 за исключением гена env, и векторов, несущих кассету env/rev ВИЧ-1 различных субтипов. Для инфицирования использовалась клеточная линия Tzm-bl, содержащая рецептор CD4 и корецепторы CCR5 и CXCR4, а также репортерный ген люциферазы, который активируется при попадании белков ВИЧ-1 в цитоплазму. Экспрессия активированного гена люциферазы в инфицированных клетках детектировалась с помощью люминометра (рис. 8). Интенсивность люминесценции пропорциональна уровню инфекции, а подавление люминесценции соответствует нейтрализации ВИЧ-инфекции [93, 100].

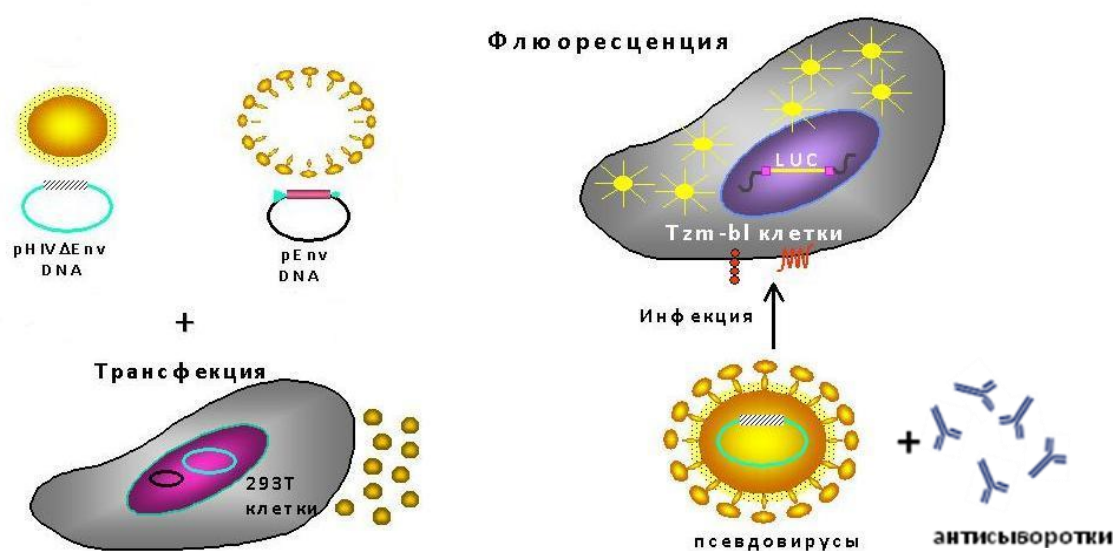


Рис. 8. Схема проведения теста вируснейтрализации. Пояснения в тексте диссертации. Рисунок взят из работы Осаки и др. [120]

Реакцию вируснейтрализации проводили с иммунными сыворотками, забор которых производился через неделю после третьей иммунизации суспензиями образцов фагов № 1 и № 9. Использовались псевдовирусные частицы, полученные на основе штаммов ВИЧ-1 субтипов А, В и AG (см. главу "Материалы и методы"). Концентрация псевдовирусов при постановке реакции нейтрализации составляла 200 TCID₅₀/100 мкл. Для оценки нейтрализующей активности антисывороток использовались последовательные их пятикратные разведения в диапазоне от 1:40 до 1:625000. Уровень люминесцентного сигнала выражался в RLU (относительные единицы люминесценции).

Для каждого штамма псевдовирусов проводилось три параллельных ряда измерений; из значений люминесценции вычитался фоновый сигнал, регистрируемый в отсутствие псевдовирусов. Полученные данные логарифмировались, далее вычислялось среднее арифметическое значение.

При статистической обработке данных использовался многофакторный регрессионный анализ. Для построения регрессионной модели использовались логарифмированные значения люминесценции, поскольку, как выяснилось в дальнейшем, по сравнению с моделью на основе исходных данных коэффициент детерминации R^2 был больше, при этом достоверных отличий между моделями не наблюдалось. Распределения логарифмированных значений люминесценции, полученных при постановке вируснейтрализации с использованием сывороток экспериментальных животных при различных концентрациях, представлены на рис. 9.

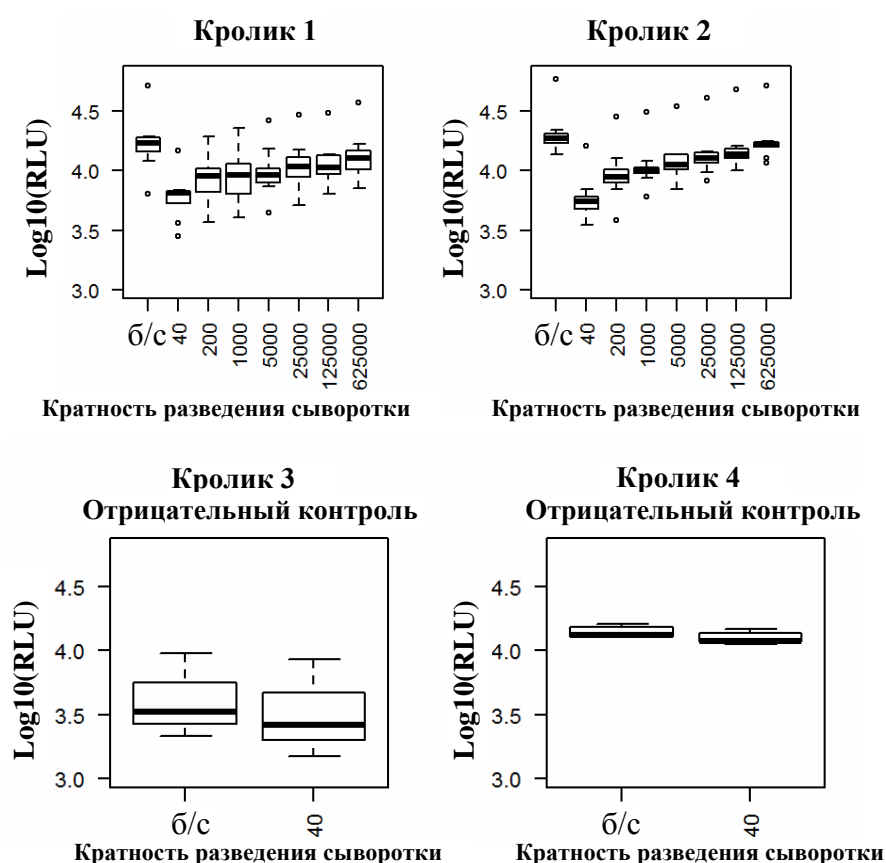


Рис. 9. Распределение значений люминесценции, полученных при постановке вируснейтрализации с использованием различных концентраций сывороток экспериментальных животных. Кролики №3 и №4 – отрицательный контроль, были иммунизированы бактериофагом M13, не содержащим рандомизированной встройки; б/с – отсутствие сыворотки, т.е. сигнал, производимый смесью псевдовирусы+клетки

Как можно заметить, в случае опытных образцов видна четкая обратная зависимость уровня сигнала от концентрации добавляемой антисыворотки. При этом разница между фоновым сигналом (б/с) и сигналом сыворотки при разведении 1:40 намного превышает аналогичную величину для контрольных сывороток.

Далее было создано несколько моделей, включающих в разных комбинациях такие факторы как *штамм вируса*, *субтип*, *титр сыворотки*, *индивидуальные особенности животного* и *антиген*. Стоит отметить, что точку, соответствующую отсутствию сыворотки (б/с), было решено приравнять к максимальному разведению, а остальные точки расположить в порядке возрастания концентрации. Учитывая природу анализируемых данных, это преобразование не привело к искажению результатов моделирования, зато позволило значительно увеличить долю дисперсии, объясненной полученной моделью, по сравнению с моделью, использующей оригинальные значения титров сыворотки. Затем с помощью информационного критерия Акаике был произведен отбор факторов и выбрана наилучшая модель. Далее, используя функцию *calc.relimp* из пакета *relaimpo* для *R*, была определена относительная важность каждого из факторов, учтенных в модели (рис. 10):

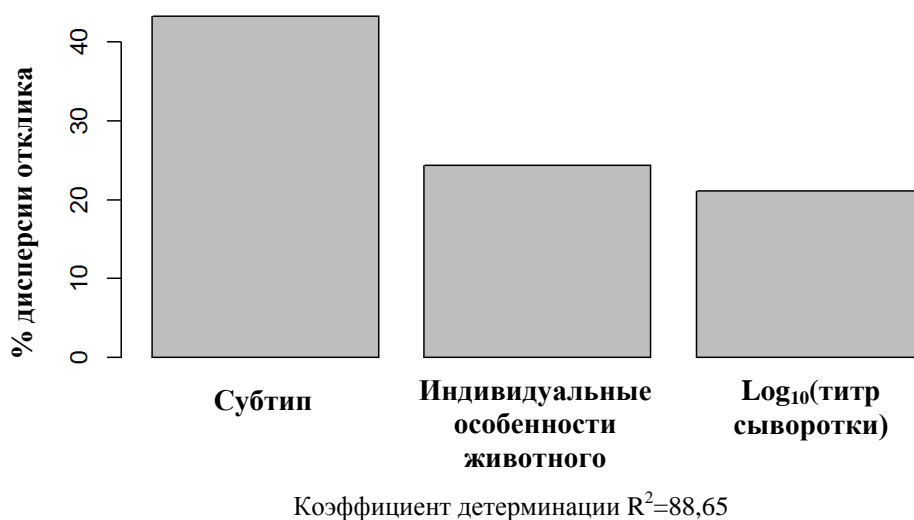


Рис. 10. Относительная значимость факторов в построенной модели. Поскольку относительная значимость может быть рассчитана только для независимых факторов (а в исходной модели скоррелированных факторов довольно много), с помощью функции *stepAIC* был проведен выбор наиболее значимых и взаимно независимых факторов, которые представлены на рисунке

Из рис. 10 видно, что при рассмотрении относительной важности параметров наибольшее значение имеет субтип вируса. Это не должно вызывать удивление, поскольку известно, что разные субтипы обладают различной устойчивостью к

действию нейтрализующих антител, в том числе и к bnAbs. В частности, штамм PVO.4 относится к третьей (наиболее устойчивой к нейтрализации) группе штаммов ВИЧ-1, а QH0692.42 и RHRA4259.7 – ко второй. Видно также, что большое значение имеют индивидуальные особенности животных. Значительная величина этого фактора обусловлена малой выборкой животных, использовавшихся в эксперименте. Тем не менее, вклад параметра "титр антисыворотки" также существенен, что свидетельствует о дозозависимом нейтрализующем эффекте, проявляемым иммунными сыворотками. Результат регрессионного анализа это подтвердил: данный фактор (титр сыворотки) достоверно влияет на изменение люминесцентного сигнала, т.е. на нейтрализующую способность сывороток.

Помимо кроликов, бактериофагами № 1 и № 9 были иммунизированы также и мыши. Иммунизировали две группы животных (самцов линии BALB/c); после третьей иммунизации проводили анализ антисывороток с помощью вестерн-блота. (К сожалению, к моменту получения антисывороток возможности проверить их в тесте вируснейтрализации уже не было, поскольку вышеописанные эксперименты автор выполнял в США, в Центре исследований онкологических заболеваний Национальных Институтов Здоровья, NIH, на базе Лаборатории ретровирусной репликации под руководством доктора Патака).

Было показано, что в сыворотках мышей, иммунизированных бактериофагами № 1 и № 9, определяются антитела, специфично взаимодействующие с белком gp41 ВИЧ-1 (рис. 11, дорожки 2 и 3). Этот результат является дополнительным подтверждением адекватности выбранного подхода для решения поставленных задач.

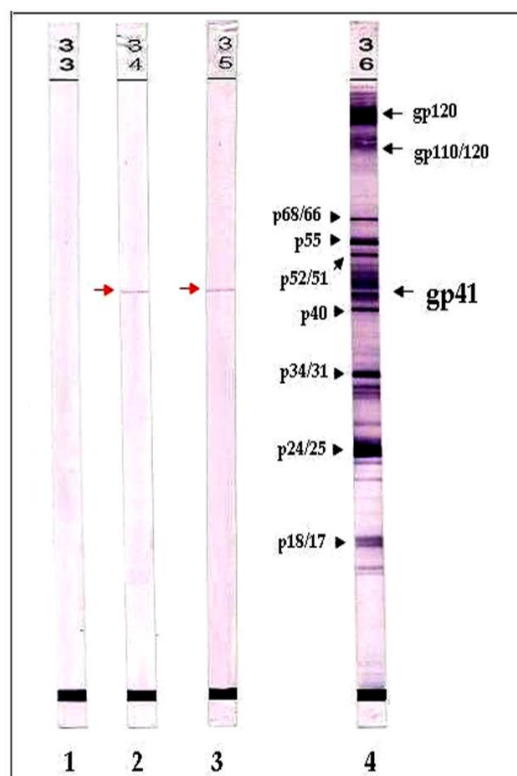


Рис. 11. Специфическая активность сывороток иммунизированных животных с помощью тест-системы NewLav Blot1. Сыворотки мышей, иммунизированных 1 – бактериофагом без встройки (отрицательный контроль); 2 – бактериофагом № 9 (пептид-имитатор EWTNWLDITNLA); 3 – бактериофагом № 1 (пептид-имитатор WTKDHNLYLDITV); 4 – положительный контроль – сыворотка ВИЧ-положительного пациента

Таким образом, при селекции 12-мерной библиотеки был обнаружен ряд клонов, содержащих общий консенсусный мотив, который имеет очевидное сходство с аминокислотными последовательностями, обнаруженными в работах других авторов, хотя и не в точности копирует их. Анализ антигенных и иммуногенных свойств полученных фаговых клонов подтверждает, что входящие в их состав пептиды способны имитировать антигенную детерминанту, узнаваемую bnAb Z13e1.

3.2. Результаты аффинной селекции и анализ фаговых клонов, селектированных с использованием моноклонального антитела IgG1b12

3.2.1. Аффинная селекция фаговых библиотек с моноклональным антителом IgG1b12 и анализ отобранных фаговых клонов

Моноклональные антитела IgG1b12 является одним из первых открытых нейтрализующих антител широкого спектра действия. Эпитоп, узнаваемый b12,

перекрывается с последовательностью CD4bs gp120 ВИЧ-1, и сформирован дискретным набором а.о. Поэтому при проведении аффинной селекции с использованием данных антител дополнительно использовалась "кольцевая" библиотека Ph.D-C7C, в которой рандомизированный пептидный фрагмент фланкирован по обоим концам цистеинами. В процессе сборки фаговых частиц из данной библиотеки происходит окисление цистеиновых остатков с образованием дисульфидных S-S мостиков, в результате чего пептид экспонируется на поверхности бактериофага в составе белка рIII в виде замкнутой по концам петли. Цистеиновый мостик формирует циклическую структуру, которая накладывает конформационные ограничения на встроенный пептид, в результате он жестко зафиксирован, в отличие от гибких линейных пептидов в библиотеках Ph.D-12 и Ph.D-7. Эта особенность при определенных условиях позволяет более эффективно проводить аффинную селекцию. В частности, производитель рекомендует использовать этот набор, если в качестве молекулы-мишени используется антитело, узнающее конформационный эпитоп (например, располагающийся в контексте поверхностных петель).

Эксперимент проводился по аналогичной схеме, описанной для bnAb Z13e1. С использованием каждой библиотеки проводилось по одной процедуре биопэннинга, включавшей три раунда селекции, при этом в каждом последующем раунде происходило увеличение процента отбираемых клонов. Для дальнейшего анализа из каждой обогащенной библиотеки произвольно было взято по 60 фаговых клонов (таблица 5).

ДНК выбранных клонов секвенировали для определения последовательностей аминокислотных остатков, входящих в состав рандомизированных пептидов. Выровненные аминокислотные последовательности представлены в таблице 6. Анализ сходства аминокислотных последовательностей показал, что среди пептидов, экспонируемых на поверхности исследуемых бактериофагов, не обнаруживаются сколько-нибудь протяженные мотивы. Кроме того, существенная часть исследуемых пептидов имела гомологию с РВ-клонами, которые являются результатом неспецифического отбора на пластик иммунологических планшетов (в таблице не представлены).

Обогащение фаговых библиотек в ходе биопэннинга

Фаговая библиотека	Номер раунда аффинной селекции	Входящий титр	Титр элюата	Выход (%)*	Фактор обогащения**	Кол-во фаговых клонов
Ph.D-12	I	1×10^{11}	4×10^5	4×10^{-4}	1	60
	II	1×10^{11}	$2,1 \times 10^8$	$2,1 \times 10^{-1}$	525	
	III	1×10^{11}	1×10^{10}	10	47,6	
Ph.D-C7C	I	1×10^{11}	6×10^5	6×10^{-4}	1	60
	II	1×10^{11}	2×10^8	0,2	333,3	
	III	1×10^{11}	6×10^8	0,6	1000	
Ph.D-7	I	1×10^{11}	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^{-4}$	1	60
	II	1×10^{11}	8×10^7	0,08	533,3	
	III	1×10^{11}	2×10^8	2	1333	

*Выход (%)=(кол-во элюированных фагов $\times 100$ %)/(кол-во вносимых фагов)

**Фактор обогащения вычислялся следующим образом: отношение входящего титра к титру элюированных фагов в первом раунде принимали за условное значение, равное 1. Для последующих раундов вычисляли значение обогащения по отношению к нормализованному значению в первом раунде [173]

3.2.2. Характеристика антигенных свойств отобранных клонов

Для проверки специфичности связывания отобранных бактериофагов с bnAb IgG1b12 использовался дот блот анализ. Результаты представлены в таблице 7 в виде условных обозначений. В зависимости от интенсивности окраски спотов на нитроцеллюлозной мембране им присваивались соответствующие обозначения: символ «++++» обозначает самые яркие пятна; «+» соответствует спотам с наименьшей интенсивностью окраски; прочерк обозначает отсутствие сигнала. В качестве примера на рис. 12 представлено сканированное изображение нитроцеллюлозной мембраны, на которую нанесены последовательные разведения суспензии фагов, несущих пептиды, отобранные из библиотеки Ph.D-C7C, а также бактериофага, не экспонирующего рандомизированный пептид, в качестве отрицательного контроля.

Структуры пептидов из фагов, отобранных с использованием bnAb IgG1b12

Библиотека Ph.D-12			Библиотека Ph.D-C7C			Библиотека Ph.D-7		
№ клона	Экспонируемый пептид	Кол-во отобранных фагов	№ клона	Экспонируемый пептид	Кол-во отобранных фагов	№ клона	Экспонируемый пептид	Кол-во отобранных фагов
22	GYEAYFAPLSRN	1	4	CCVAPFL----	1	5	PWYHWP	10
39	HPWYIHHWQSRL	1	20	-RSTPFLV---	1	35	GWYWWSW	2
27	HDIPRWITRHP	1	6	---FPEPRAP-	1	1	FWYNWPR	1
8	SHWWTRWNALAL	2	33	--WFPSLRD--	3	21	PWYAWPR	1
44	GHYIHWNNWKFD	1	28	-SHRPPLT---	3	2	FHWTWYW	9
60	FHWKWSSQYVPS	1	27	----PSLRHLP-	2			
38	FHWNKSWYMMPT	1	3	----TSLSPPS-	1			
49	HWYHFHNQPTAT	1	5	----LLADTVS	4			
35	FHRNFFGWPAL	1	2	--PERLLDD---	1			
11	FHRSHWYQTWVP	1	30	----GSLWFQA-	1			
21	FHTRFLSLYALQ	2	32	--PTGLLNA---	1			
57	FHKTWWTAAALS	5	38	----GLLIGNS-	1			
33	FHKWPGWTNQTY	1	25	----GLLATSP-	1			
40	WHYPRLHSWFTQ	3	14	----GLRWHSP-	1			
48	WHYTDFTRWNRQ	1	12	---SPLFVPS--	1			
19	WHFTWWVDNRMT	1	16	----QLFGPNA-	1			
51	WPFHTHTTFWRT	1	17	-----LFAHAPH	1			
45	WHWPWPRTSPT	2	26	--LNPIFHA---	2			
41	WHWPQFWQAANT	1	22	----VLRHGFV-	1			
43	WHKTPWFPTNL	1	10	---CPWCGPL--	1			
29	WHKWPTAIPAAL	1	36	---THQYSGF--	1			
58	WHRWTWAPPELL	1	19	-----LAGDMPH	1			
55	WHPWSWTYALPM	1	29	---SSEHGDF	1			
10	ALPHFTRTSSSS	1						
28	YAPHNYEERGNA	1						
34	HLNILSTLWKYR	1						
1	SSYYLTHPTFAI	1						

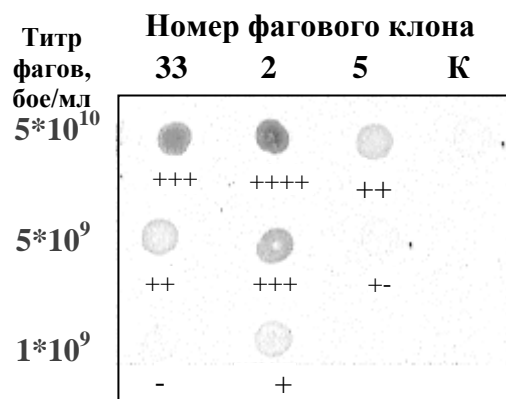


Рис. 12. Дот блот суспензии фаговых клонов, экспонирующих пептиды, отобранные из библиотеки Ph.D-C7C

Таблица 7

Интенсивность сигналов в дот блоте при анализе бактериофагов, отобранных с использованием МКА IgG1b12

Фаговая библиотека	Номер пептида (клона)	Интенсивность окраски спотов при различных титрах бактериофагов			Аминокислотная последовательность пептида	Кол-во повторов
		5×10^{10}	5×10^9	1×10^9		
Ph.D-C7C	2	++++	+++-	+	PFRLDD	2
	5	++	+-	-	LLADTVS	1
	33	+++	++	-	WFPSLRD	3
	отрицательный контроль	-	-	-	—	
Ph.D-12	1	+	+	-	SSYYLTHPTFAI	1
	8	++	+	-	SHWWTRWNALAL	1
	9	++	+	-	WHYPRLHSWFTQ	1
	11	+	+-	-	FHRSHWYQTWVP	1
	19	++	+	-	WHFTWWVDNRMT	1
	21	++	+	-	FHTRFLSLYALQ	1
	39	++	+	-	HPWYIHHWQSRL	1
	отрицательный контроль	-	-	-	—	
Ph.D-7	1	-	-	-	FWYNWPR	1
	2	-	-	-	FHWTWYW	9
	5	-	-	-	PWYHWP	10
	21	-	-	-	PWYAWPR	1
	35	-	-	-	GWYWWSW	2
	отрицательный контроль	-	-	-	—	

Наиболее сильный сигнал продемонстрировали фаговые клоны № 2 и № 33, экспонирующие 7-мерные кольцевые пептиды; для положительных клонов (№№ 1, 8, 9, 11, 19, 21, 39) из 12-мерной библиотеки уровень сигналов был значительно ниже (см. таблицу 7). Все остальные фаговые частицы с bnAb IgG1b12 в дот блоте не взаимодействовали.

Обращает на себя внимание факт полного отсутствия позитивных сигналов среди пептидов из линейной 7-мерной библиотеки. Этому можно дать два объяснения:

- Недостаточная представительность данной конкретной библиотеки не обеспечивает достаточного разнообразия клонов, необходимого для получения пептидомимотопов (представительность могла снизиться вследствие длительного хранения);
- Возможно, что линейные семичленные пептиды слишком коротки для того, чтобы успешно сформировать объемную структуру, взаимодействующую с паратопом по принципу "ключ-замок".

3.2.3. Анализ аминокислотных последовательностей пептидов, взаимодействующих с моноклональным антителом IgG1b12

Как уже упоминалось ранее, эпитоп, узнаваемый bnAb IgG1b12, является конформационным, вследствие чего его картирование затруднено. Неоднократно предпринимались попытки найти консенсусный мотив эпитопа с помощью фагового дисплея. Бутц с соавт. при скрининге 15- и 21-мерных фаговых библиотек не смогли найти консенсусной последовательности, однако ими был обнаружен пептид NWPRWEEFVDKHSS, который эффективно конкурировал с вирусным антигеном gp120 за связывание с bnAb IgG1b12 [26].

Другими научными группами были отобраны пептиды-миметики, имеющие консенсусный мотив SDL [23, 184]. По данным Цвика, наиболее специфично с bnAb IgG1b12 взаимодействовал пептид B2.1 HERSYMFSDLNRCI. Похожие, но не идентичные результаты были независимо получены в двух других лабораториях: в одном случае мимотоп содержал мотив WSDL [50], в другом консенсус имел вид GLLVWSDEL [46]. В конечном счете, общим для последних трех указанных пептидов является мотив SD. Таким образом, можно отметить, что в опубликованной литературе нет однозначно принятого взгляда на структуру эпитопа, узнаваемого bnAb IgG1b12.

Наиболее протяженный гомологичный участок между отобранными при дот-блоте последовательностями составлял 2-3 аминокислотных остатка (рис. 13).

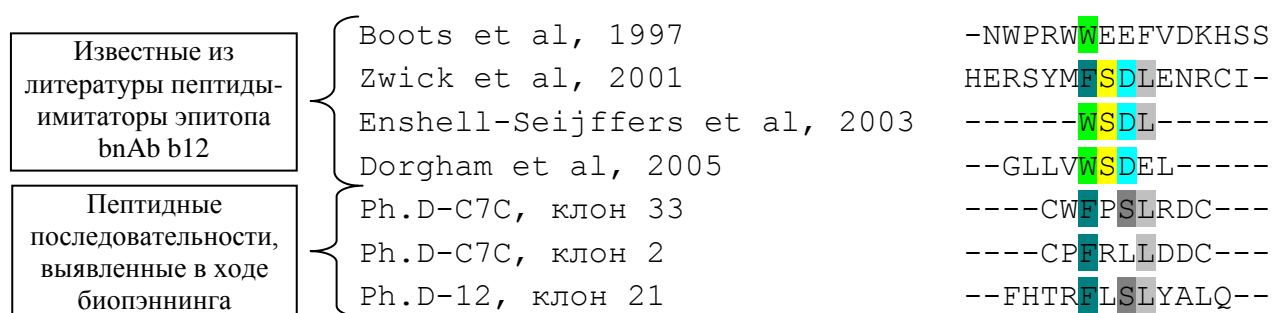


Рис. 13. Выравнивание пептидов, экспонированных на поверхности отобранных бактериофагов, и пептидов-имитаторов эпитопа, узнаваемого bnAb IgG1b12. В список не были включены пептиды, для которых не было обнаружено какого-либо общего мотива

Выявленный мотив $x\mathbf{F}x\mathbf{SL}xx(x\mathbf{F}xx\mathbf{L}xx)$ не совпадает с консенсусной последовательностью **SDL**, найденной в указанных выше работах. Возможно, причиной расхождения является использование фаговых библиотек, отличающихся по типу и

размеру от библиотек в исследованиях зарубежных лабораторий. В частности, в них не применялись библиотеки кольцевых пептидов, входящих в состав фагов.

3.2.4. Оценка способности отобранных фаготов конкурировать с вирусным антигеном за связывание с моноклональным антителом IgG1b12

Пептиды, обнаруженные в результате скрининга фаговых библиотек Ph.D-12 и Ph.D-C7C, были синтезированы и проверены в тесте вируснейтрализации на способность конкурировать с ВИЧ-1 за связывание с bnAb IgG1b12. Список синтезированных пептидов представлен в таблице 8. Эксперимент по вируснейтрализации выполнялся по схеме, приведенной на рис. 14.

В тех случаях, когда пептиды хорошо растворялись в водных системах, рабочие концентрации составляли 1 мг/мл. Для растворения гидрофобных пептидов приходилось использовать органические растворители (DMSO, DMF). В результате при дальнейшем разбавлении водой до физиологически допустимых значений органических добавок (~1 %) концентрации пептидов в рабочих растворах существенно понижались.

Таблица 8

Список синтезированных пептидов

Библиотека	№ пептида	Структура пептида
Ph.D-12	A1	DLNHHDITSDKY
	A2	FHRSHWYQTWVP
	A3	WHYPRLHSWFTQ
	A4	FHKTWWTAAALSR
	A5	GYEAYFAPLSRN
	A6	HLNILSTLWKY
	A7	WHYTDFTRWNRQ
	A8	HPWYIHHWQSRL
	A9	HDIPRWYITRHP
	A10	FHWNKSWYMMPT
	b12-7	SHWWTRWNALAL
	b12-8	WHYPRLHSWFTQ
	b12-9	FHRSHWYQTWVP
Ph.D-C7C	b12-10	FHKTWWTAAALSR
	b12-1	CPFRLDDC
	b12-2	CLLADTVSC
	b12-3	CWFPSLRDC
	b12-4	CDFRSLDRC
	b12-5	CLLADTVSC
	b12-6	CWFPSLRDC

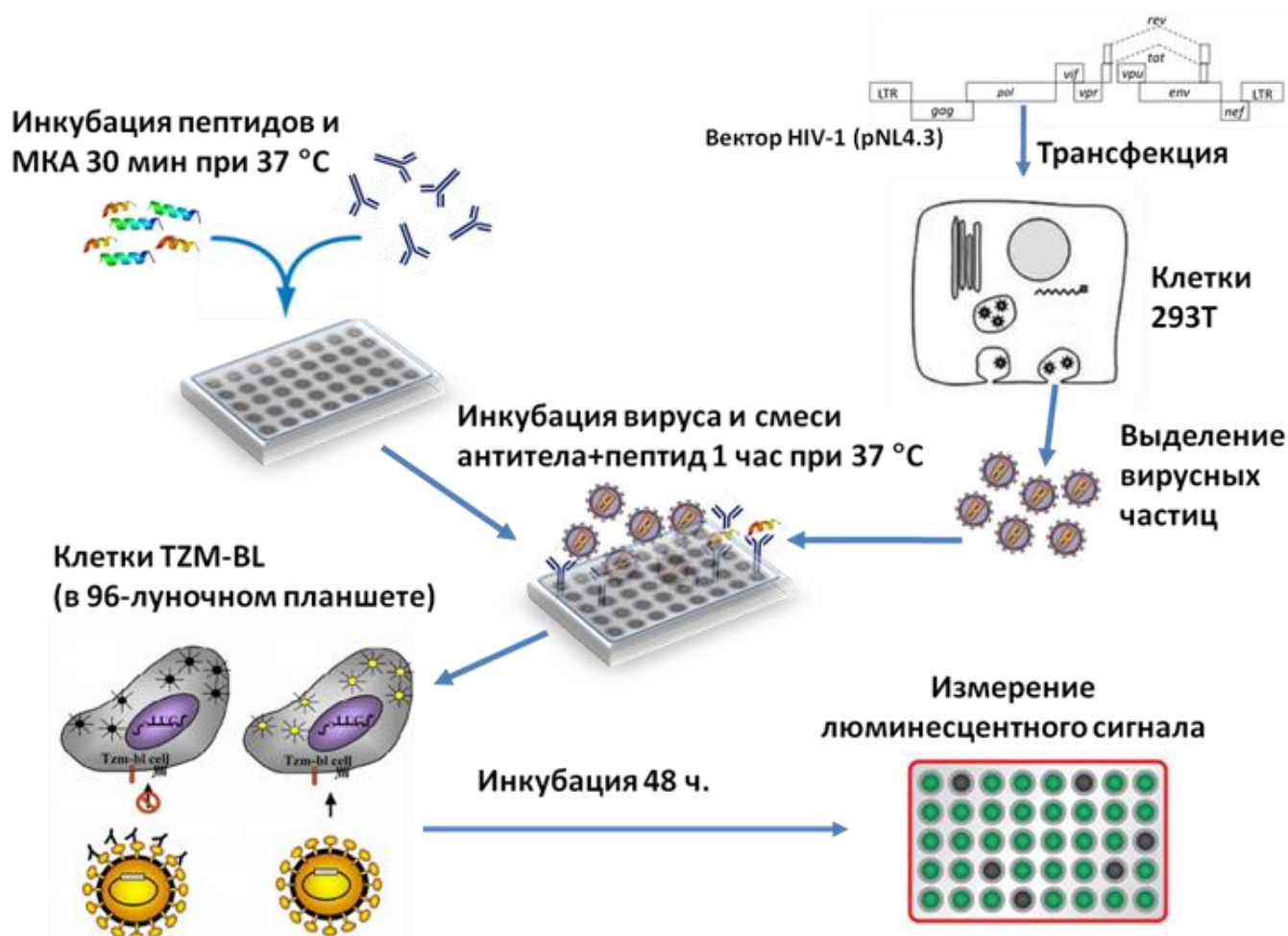


Рис. 14. Схема постановки эксперимента по оценке способности отобранных пептидов связываться с bnAb и ингибировать его вируснейтрализующую активность. Эффективность нейтрализации связана обратной зависимостью с уровнем люминесценции в ячейках планшета, в которые вносятся клетки TZM-bl, инфицируемые ВИЧ-1. Предварительно вирусные частицы получают путем трансфекции клеток 293T плазмидным вектором, кодирующим геном вируса. Синтез люциферазы в клетках TZM-bl запускается при попадании в клетку белка ТАТ ВИЧ-1. При полной нейтрализации антителами уровень люминесценции снижается до фонового уровня. При добавлении пептида-миметика происходит блокировка антител, вследствие чего увеличивается количество вирусных частиц, способных к заражению. Соответственно, возрастает люминесцентный сигнал

После проведения опыта было обнаружено, что только один пептид (А7, фаговый клон № 48) из исследованных в эксперименте продемонстрировал статистически значимое (однако очень слабое) ингибирующее влияние на нейтрализующую активность антител (рис. 15).

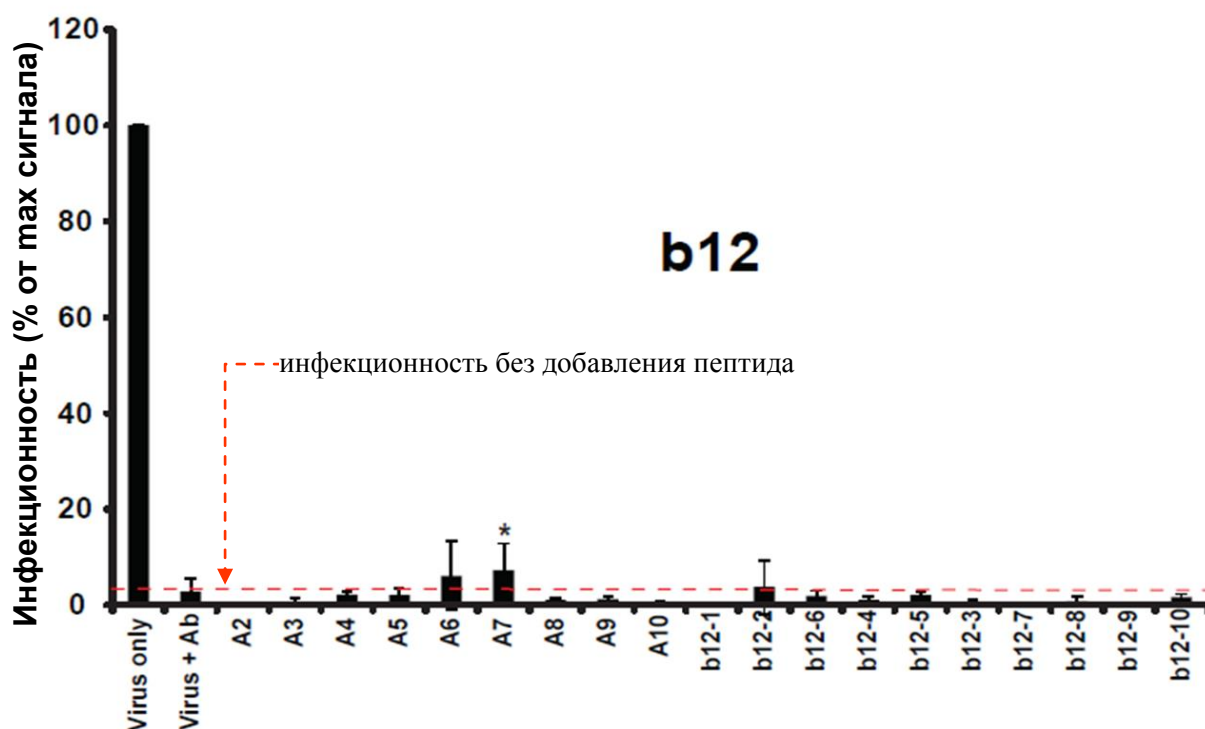


Рис. 15. Ингибирование нейтрализующей активности bnAb IgG1b12 в реакции вируснейтрализации с использованием синтезированных пептидов. За 100 % принято показание люминесценции, производимое вирусом без добавления антител и пептидов. Красной пунктирной линией обозначен уровень сигнала, производимый вирусом с добавлением антител без пептидов (отрицательный контроль). Символом* обозначены значения люминесценции, статистически значимо отличающиеся от фонового сигнала (t test; $P < 0,05$)

Полученные результаты плохо коррелируют с данными дот блот анализа. В частности, пептиды b12-1, b12-2, b12-6, входящие в состав фаговых клонов №№ 2, 5 и 33, не показали какого-либо превышения над фоновым уровнем, несмотря на то, что именно эти клоны демонстрировали максимальный сигнал в иммуноблотинге. В то же время бактериофаг № 48, несущий пептид A7, не взаимодействовал с bnAb IgG1b12 в дот блоте.

Отсутствие сигнала для пептидов b12-1, b12-2, b12-6, вероятно, объясняется тем, что они входили в группу плохо растворимых, и их концентрацию пришлось понижать до ~0,01 мг/мл. Что касается A7, то отсутствие сигнала в дот блоте может объясняться разницей в порядке сорбции в биоэппинге и иммуноблотинге. В первом случае на твердую фазу (полистирол планшета) наносятся антитела, к которым после блокировки добавляются фаговые частицы. В дот блот анализе на твердую фазу (нитроцеллюлозу), напротив, наносятся бактериофаги, а сверху (после блокировки) добавляются антитела. В этом случае можно предположить, что доступность экспонируемого пептида для

антител понижается вследствие взаимодействия бактериофага с нитроцеллюлозной подложкой.

Исходя из приведенных выше рассуждений, для проверки иммуногенных свойств потенциальных фаготопов были выбраны клоны, продемонстрировавшие наилучшие результаты хотя бы в одном из выше описанных тестов. Таким образом, для последующей иммунизации лабораторных животных использовались клоны №№ 48 (из библиотеки Ph.D-12), №№ 2, 5 и 33 (Ph.D-C7C), несущие, соответственно, пептиды A7, b12-1, b12-2 и b12-3 а также фаг M13, не содержащий в белке оболочки рандомизированной пептидной вставки (отрицательный контроль).

3.2.5. Проверка нейтрализующей активности сывороток животных, иммунизированных бактериофагами

Для проверки иммуногенности фаговых частиц, экспонирующих пептиды A7, b12-1, b12-2 и b12-3, была проведена иммунизация лабораторных животных очищенными препаратами указанных фагов (№№ 48, 2, 5 и 33). Контрольной группе мышей вводили бактериофаг M13, не несущий встройки.

Антисыворотки проверяли в тесте вируснейтрализации (см. рис. 8) с использованием псевдовирусов, полученных на основе штаммов QH0692.42 и PVO.4 ВИЧ-1. Штамм QH0692.42 относится к группе среднеустойчивых к нейтрализующему действию bnAb IgG1b12, в то время как PVO.4 обладает повышенной устойчивостью к действию этих антител. Результаты представлены в таблице 9 в виде значений IC_{50} , рассчитанных путем обработки данных интенсивности люминесценции методом пробит–регрессии. Использовалась программа Probit Analysis, в основе которой лежит алгоритм метода максимального правдоподобия. Программа предназначена для обработки кривых «Доза–Эффект» и позволяет вычислять эффективную дозу, а также соответствующие доверительные интервалы для 5 %-ного уровня значимости.

По результатам экспериментов обнаружилось, что объединенная сыворотка, полученная после иммунизации мышей бактериофагом № 2, вызывает заметное снижение люминесцентного сигнала в тесте вируснейтрализации по сравнению с сывороткой контрольных животных, иммунизированных контрольным фагом (таблица 9).

Таблица 9

Чувствительность Env клонов к нейтрализации сыворотками мышей, иммунизированных отобранными фаговыми клонами

Клон Env	IC ₅₀ в клетках TZM-bl, мкг/мл общих IgG ¹		
	Фаг № 2	Фаг M13(отрицательный контроль)	МКА IgG1b12 ³
QH0692.42	228 (83; 380) ²	894 (472; 2380)	1,0
PVO.4	448 (259; 997)	2627 (1366; 6796)	>50

1 – значение IC₅₀ выражено в концентрации антител (мкг/мл), при которой происходит снижение люминесцентного сигнала на 50 %; 2 – цифры в скобках обозначают соответствующий доверительный интервал при $\alpha=0.05$; 3 – данные значения взяты из литературных данных [165]

В таблицу 9 не включены результаты анализа антисывороток, полученных после иммунизации мышей фагами № 48, 5 и 33, поскольку для них не было получено заметного превышения сигнала.

Таким образом, хотя последовательность пептида в полученном фаге № 2 не содержала найденного другими авторами консенсуса, результаты вируснейтрализации указывают на то, что содержащийся в фаге № 2 пептид является истинным миметиком эпитопа bnAb IgG1b12. Полученные в результате иммунизации антисыворотки содержали антитела, способные подавлять инфекционность не только среднеустойчивого штамма QH0692.42 ВИЧ-1, но и высокоустойчивого PVO.4.

3.3. Результаты аффинной селекции и анализ фаговых клонов, селектированных с использованием моноклональных антител VRC01

3.3.1. Аффинная селекция фаговых библиотек с моноклональным антителом VRC01 и анализ отобранных фаговых клонов

Эпитоп, узнаваемый VRC01, как и в случае IgG1b12, перекрывается с областью CD4bs gp120 ВИЧ-1, и также сформирован дискретным набором а.о. Поэтому аффинная

селекция с использованием данных антител тоже проводилась со всеми тремя библиотеками, включая кольцевую.

С каждой из перечисленных фаговых библиотек проводилось 3 раунда аффинной селекции. После биопэннинга библиотек Ph.D-7 и Ph.D-C7 по данным секвенирования выяснилось, что среди отобранных фагов преобладали клоны, содержащие аминокислотные мотивы, неспецифически связывающиеся с пластиком планшетов. По этой причине для повышения специфичности при скрининге линейной и кольцевой 7-мерных библиотек в качестве иммобилизирующего носителя для антител была использована альтернативная платформа – магнитные частицы, конъюгированные с белками A и G. Смена носителя привела к резкому снижению количества РВ-клонов среди отобранных из "циклической" библиотеки Ph.D-C7C. В то же время для линейной 7-мерной библиотеки Ph.D-7 снижение уровня неспецифики было незначительным (см. таблицу 10).

После биопэннинга фаговые элюаты высевали на агаризованную среду. Для дальнейшего анализа селектированных фаговых клонов с помощью микробиологической петли произвольным образом было захвачено и амплифицировано 130 фаговых бляшек из 12-мерной библиотеки, и по 60 бактериофагов из 7-мерных. ДНК отобранных клонов была секвенирована. По результатам анализа было проведено выравнивание аминокислотных последовательностей (таблица 10).

Анализ аминокислотных последовательностей показал, что среди пептидов, отобранных из *разных* библиотек, гомологичных последовательностей нет. Исключением является мотив xPxLYxx из Ph.D-7 и xxxPxLYxxxxx из 12-мерных клонов №№ 3 и 5, но он не перекрывается с консесусом 12-мерной библиотеки. Среди фагов *внутри* библиотек Ph.D-12 и Ph.D-C7C удалось обнаружить мотивы длиной 5 и 3 а.о. соответственно. При этом большинство фаговых клонов, отобранных из библиотеки Ph.D-12, экспонировали пептиды, имеющие вид **UOxxJUxxWxxx**, где **x** – любой аминокислотный остаток, **U** – гидрофобный неароматический (**Leu**, **Ile** либо **Val**), **O** – **Ser** либо **Thr**, **J** – отрицательно заряженный (**Asp** либо **Glu**). "Кольцевые" 7-мерные пептиды имеют более разнородный состав, общий мотив выглядит следующим образом: **xWxL_{F/Y}xxF_Y**.

Таблица 10

Последовательности пептидов, входящие в состав отобранных фаговых клонов из библиотек Ph.D-12 и Ph.D-C7C в эксперименте с использованием bnAb VRC01*

Библиотека Ph.D-12			Библиотека Ph.D-C7C		
Номер групп фагов	Экспонируемый пептид	Кол-во отобранных фагов	Номер групп фагов	Экспонируемый пептид	Кол-во отобранных фагов
1	ITIQEITAWPES--	1	1	NWEEFWKY	5
2	--GQPWTTWLESNT	2	2	NWEEFWKY	5
3	ITAPELYAWFGS--	1	3	EWRYWEY	1
4	ITLPELHAWKEN--	1	4	EWTWFGY	1
5	VSWPELYKWTWS--	16	5	TFTYWGF	1
6	ITNAELTNWNG--	2	6	QWTYYNF	1
7	ITTSEIYNWRDT--	3	7	SWTLLGY	5
8	VTLGELVSWPAE--	1	8	PWYLMGY	1
9	MDLAELSNWPHA--	1	9	SWNLMGF	5
10	LTNQELLTWTAY--	1	10	SWNLMGF	5
11	LTWGE MHTWTVQ--	20	11	PWVLHGF	4
12	LTMEELTRWSVY--	1	12	DWLLHGF	1
13	LTLEELLFWKSP--	1	13	PWMLSGF	1
14	LSWEELLRWASP--	1	14	LWMLEKF	1
15	LTRLLELDWSP--	1	15	EWSLWSF	6
16	LTHTELLHWNGM--	1	16	NWSLLSF	1
17	LSIADLYRWNTS--	1	17	TWTLLSF	4
18	ITQADVWAWDTS--	1	18	SWSLLDF	1
19	-ITFDILDYWTISN-	4	19	LWSLTGF	1
20	-WQIWEYWPMDHN-	1	20	TWSLSGF	1
			21	SWSLNGF	3
			22	IWEELGF	2
			23	THSRAGS	1

Цветом выделены гомологичные аминокислотные остатки; номера фаговых клонов, экспонирующих соответствующий пептид, указаны слева от аминокислотных последовательностей. В таблице представлены только уникальные пептиды. В случае, если несколько разных фаговых клонов экспонировали одинаковый пептид, их группировали под одним номером.

***Примечание:** Данные селекции из 7-мерной линейной библиотеки не представлены, поскольку среди выявленных пептидных последовательностей значимого консенсуса обнаружено не было.

3.3.2. Характеристика антигенных свойств отобранных бактериофагов

Специфичность связывания выделенных бактериофагов с МКА подтверждалась с помощью дот блот анализа. Результаты представлены в таблице 11 в виде условных обозначений, аналогичных ранее введенным для IgG1b12 (от «++++» в случае максимального сигнала до «—» при его отсутствии). В качестве примера на рис. 15

представлено сканированное изображение нитроцеллюлозной мембраны, на которую нанесены последовательные разведения суспензии фагов, несущих пептиды C4 и C1 (отобраны из библиотеки Ph.D-C7C), а также бактериофага, не экспонирующего рандомизированный пептид, в качестве отрицательного контроля.

Таблица 11

Интенсивность сигналов в дот блот анализе бактериофагов, отобранных с использованием МКА VRC01*

Фаговая библиотека	Номер пептида (фагового клона)	Интенсивность окраски спотов при различных титрах бактериофагов			Аминокислотная последовательность пептида	Кол-во клонов с указанным пептидом
		5×10^{10}	5×10^9	1×10^9		
Ph.D-12	E1 (5)	++++	+++	+	VSWPELYKWTWS	16
	E2 (3)	++++	+++	+	ITAPELYAWFGS	1
	E3 (11)	++++	+++	+	LTWGEMHTWTVQ	20
	E4 (12)	+++	+++	-	LTMEELTRWSVY	1
	E5 (4)	++	+	-	ITLPELHAWKEN	1
	E6 (1)	++++	+++	-	ITIQEITAWPES	1
	E7 (10)	+++	+	-	LTNQELLTWTAY	1
	E8 (6)	++	++	-	ITNAELTNWNNG	2
	E9 (9)	++	+	-	MDLAELSNWPHA	1
	E10 (19)	+	-	-	TTFDILDYWTSN	4
	E11 (17)	++	-	-	LSIADLYRWNTS	1
	E12 (2)	+	-	-	GQPWTTWLESNT	2
	E13 (7)	++	+	-	ITTSEIYNWRDT	3
	E14 (20)	-	-	-	WQIWEYWPMDHN	1
	E15 (8)	+-	+-	-	VTLGELVSWPAE	1
	E16 (13)	+	+-	-	LTLEELLFWKSP	1
	E17 (15)	++	+	-	LTRLELLEWDSP	1
	E18 (14)	+++	++	-	LSWEELLRWASP	1
	E19 (16)	+++	++	-	LHTTELLHWNGM	1
	E20 (18)	+	-	-	ITQADVWAWDTS	1
	контроль	-	-	-		
Ph.D-C7C	C1 (7)	++++	+++	-	CSWTLLGYC	5
	C2 (22)	+++	++	-	CIWEFLGFC	1
	C3 (2)	++++	+++	-	CNWEFWKYC	5
	C4 (15)	++++	++	-	CEWSLWSFC	6
	C5 (5)	++	+	-	CTFTYWGFC	1
	C6 (8)	+	+-	-	CPWYLMGYC	1
	C7 (16)	+	-	-	CNWSLLSFC	1
	C8 (4)	-	-	-	CEWTWFGYC	1
	C9 (10)	++++	+	-	CSWNLMGFC	5
	C10 (19)	+-	-	-	CLWSLTGFC	1
	C11 (6)	+++	++	-	CQWTYYNFC	1
	C12 (3)	+++	++	+	CEWRYWEYC	1

Ph.D-C7C	C13 (21)	-	-	-	CSWSLNGFC	3
	C14 (11)	++	+	+-	CPWVLHGFC	4
	C15 (2)	++++	++	-	CNWEFWKYC	5
	C16 (12)	++	-	-	CDWLLHGFC	1
	C17 (10)	++++	+	-	CSWNLMGFC	5
	C18 (13)	++	+	-	CPWMLSGFC	1
	C19 (20)	+++	-	-	CTWSLSGFC	1
	C20 (14)	+	+-	-	CLWMLEKFC	1
	C21 (23)	-	-	-	CTHSRAGSC	1
	C22 (18)	-	-	-	CSWSLLDFC	1
	C23 (17)	++++	+++	++	CTWTLLSFC	4
	контроль	-	-	-		

*Примечание: после проведения дот блот анализа с использованием фагтопов, отобранных из 7-мерной линейной библиотеки, как и в случае с IgG1b12, обнаружилось, что среди них нет ни одного клона, специфически связывающегося с VRC01. Вероятнее всего, проведение биопэннинга библиотеки Ph.D-7 привело к отбору неспецифических фаговых клонов, связывающихся с поверхностью магнитных частиц. По этой причине отобранные из линейной 7-мерной библиотеки фаговые клоны были исключены из дальнейшего исследования.

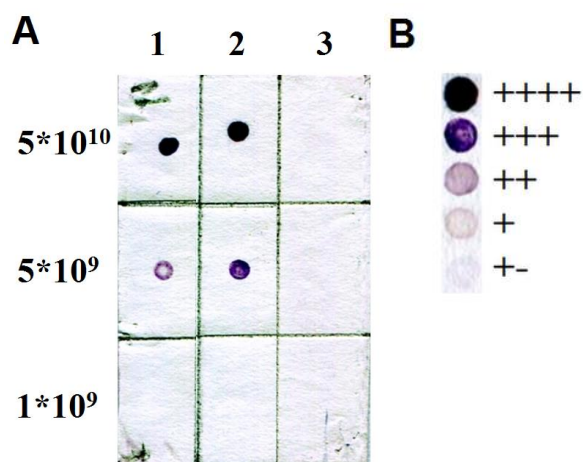


Рис. 15. А. Дот блот суспензии фаговых клонов, несущих пептиды C4 и C1 (столбцы 1 и 2). Столбец 3 – отрицательный контроль (суспензии фага M13, не несущего рандомизированной встройки). Слева указан титр суспензий, выраженный в бое/мл. **В.** Градации интенсивности окраски спотов и соответствующие ей условные обозначения

3.3.3. Компьютерный анализ аминокислотных последовательностей пептидов, взаимодействующих с моноклональным антителом VRC01

Чтобы выяснить, за счет каких аминокислотных остатков отобранные пептиды могут взаимодействовать с VRC01, использовался метод компьютерного моделирования. Был проведен независимый анализ выборки пептидов из 12- и 7-мерной

(кольцевой) библиотек. Последовательности рандомизированных пептидов, экспонирующихся на отобранных фаговых клонах, сопоставили с фрагментом гликопротеина ВИЧ-1 gp120 в районе контакта с VRC01. Для этого использовались программа Pepitope, используемая при картировании конформационных эпитопов методом фагового дисплея [104], а также сходная с ней по принципу программа pdMap. В отличие от Pepitope, pdMap производит поиск гомологий в заданном участке белковой молекулы, а не на всей ее поверхности, что потенциально может обеспечить более точные результаты. Данные о структуре комплекса VRC01–gp120, полученные методом рентгеноструктурного анализа, были взяты из работы Чжоу с соавторами [177]. В данном комплексе из структуры gp120 исключены петли V3 и V1/V2, так как они препятствуют кристаллизации gp120. В состав эпитопа входят следующие аминокислотные остатки gp120: 123, 124 и 198 (остаток 198 в структуре следует непосредственно за 124, это район удаленной петли V1/V2, поэтому нумерация не непрерывна), районы 276-283 (петля D), 365-371 (CD4-связывающая петля), 427-430, 455-474 (петля V5). Было сделано предположение, что отобранные с помощью фагового дисплея пептиды способны имитировать эпитоп, узнаваемый VRC01 на поверхности gp120. Однако сервер Pepitope не смог правильно определить соответствие пептидов и gp120: все найденные варианты лежали за пределами области CD4bs, узнаваемой VRC01. Причиной этого могут быть как особенности структуры эпитопа, так и пептидных библиотек. Не исключено также, что это может быть связано с ограничениями, накладываемыми алгоритмом программы Pepitope. В пользу данного предположения говорит тот факт, что с использованием программы pdMap удалось найти соответствие консенсусной последовательности 12-мерных линейных пептидов с участком gp120 в районе CD4-связывающей петли. В этом случае поиск соответствующего района gp120 был изначально ограничен остатками, входящими в состав эпитопа VRC01. На рис. 16 показано выравнивание фрагмента gp120 PSGGDLEITMH с пептидами из клонов, взаимодействие которых с VRC01 было подтверждено методом иммуноблотинга. Как уже отмечалось, консенсусный мотив среди 12-мерных пептидов имеет вид **UOxxJUxxWxxx**, где **X** – любой аминокислотный остаток, **U** – гидрофобный неароматический остаток (**L**, **I** либо **V**), **O** – **S** либо **T**, **J** – отрицательно заряженный (**D** либо **E**). В то же время в литературе отмечено, в число пяти ключевых остатков, вносящих наибольший вклад в связывание gp120 с VRC01,

входят D³⁶⁸ и I³⁷¹ [175]. В найденной консенсусной последовательности этим остаткам соответствуют **J** (D/E) и **U** (L/I/V), имеющие схожие физико-химические параметры и находящиеся в соответствующих положениях. Принимая во внимание, что эпитоп VRC01 не включает в себя ни одного бокового радикала триптофана, фенилаланина или тирозина [175], можно заключить, что С-концевая половина пептидов xxWxxx, по всей видимости, не имитирует районы gp120, а связывается с антителом каким-то другим образом.

Для пептидов, отобранных из кольцевой и линейной 7-мерных библиотек с использованием тех же методов поиска, на уровне аминокислотных последовательностей не было найдено сходства с фрагментом gp120 в области CD4bs.

E1	---	V	S	W	P	E	--	L	Y	K	W	T	W	S	-	
E2	---	I	T	A	P	E	--	L	Y	A	W	F	G	S	-	
E3	---	L	T	W	G	E	--	M	H	T	W	T	V	Q	-	
E4	---	L	T	M	E	E	--	L	T	R	W	S	V	Y	-	
E5	---	I	T	L	P	E	--	L	H	A	W	K	E	N	-	
E6	---	I	T	I	Q	E	--	I	T	A	W	P	E	S	-	C4
E8	---	I	T	N	A	E	--	L	T	N	W	N	N	G	-	C23
E7	---	L	T	N	Q	E	--	L	L	T	W	T	A	Y	-	C1
E9	---	M	D	L	A	E	--	L	S	N	W	P	H	A	-	C9
E10	---	T	T	F	D	-	--	I	L	D	Y	W	T	S	N	C19
E11	---	L	S	I	A	D	--	L	Y	R	W	N	T	S	-	C2
E13	---	I	T	T	S	E	--	I	Y	N	W	R	D	T	-	C3
E17	---	L	T	R	L	E	--	L	L	E	W	D	S	P	-	C11
E18	---	L	S	W	E	E	--	L	L	R	W	A	S	P	-	C12
E19	---	L	T	H	T	E	--	L	L	H	W	N	G	M	-	C15
cons	---	U	O	X	X	J	--	U	X	X	W	X	X	X	-	cons
gp120	---	P	S	G	G	D	L	E	I	T	M	H	-	-	-	gp120

C4	C	E	W	S	L	W	S	F	C	---					
C23	C	T	W	T	L	L	S	F	C	---					
C1	C	S	W	T	L	L	G	Y	C	---					
C9	C	S	W	N	L	M	G	F	C	---					
C19	C	T	W	S	L	S	G	F	C	---					
C2	C	I	W	E	F	W	K	Y	C	---					
C3	C	N	W	E	F	W	K	Y	C	---					
C11	C	Q	W	T	Y	Y	N	F	C	---					
C12	C	E	W	R	Y	W	E	Y	C	---					
C15	C	N	W	E	F	W	K	Y	C	---					
cons	-	X	W	X	X	X	X	F	-	-	-				
gp120	-	P	S	G	G	D	L	E	I	T	M	H			

Рис. 16. Выравнивание пептидов из клонов, имеющих наибольшее сродство к МКА VRC01 и фрагмента 365-371 gp120 ВИЧ-1 (последовательность расположена внизу рисунка). Цветом выделены а.о., соответствующие консенсусной последовательности. Консенсусный мотив обозначен словом «cons»

3.3.4. Оценка способности отобранных фаготопов конкурировать с МКА VRC01 за связывание с узнаваемым им эпитопом

Пептиды, обнаруженные в результате скрининга фаговых библиотек Ph.D-12 и Ph.D-C7C, были синтезированы и проверены в тесте вируснейтрализации на способность конкурировать с ВИЧ-1 за связывание с bnAb VRC01. Эксперимент выполнялся по схеме, описанной в п. 3.2.4.

Использовали два разведения пептидов с концентрациями 1 мг/мл и 0,2 мг/мл; при этом количественное соотношение антитело:пептид составляло 1:5000 и 1:1000 соответственно. В ходе опыта было обнаружено, что 9 из 44 пептидов продемонстрировали статистически значимое ингибирующее влияние на нейтрализующую активность антител (см. таблицу 12).

Таблица 12

Пептиды, показавшие наиболее высокую способность ингибировать нейтрализующую активность bnAb VRC01

Ph.D-12			Ph.D-C7C		
Номер пептида	пептид	№ соотв. фагового клона	Номер пептида	пептид	№ соотв. фагового клона
E1	VSWPELYKWTWS	5	C1	CSWTLLGYC	7
E2	ITAPELYAWFGS	3	C5	CTFTYWGFCC	5
E10	TTFDILDYWTSN	19	C9, C17	CSWNLMGFCC	10
E11	LSIADLYRWNTS	17	C13	CSWSLNGFCC	21

В их число входили четыре пептида из 12-мерной библиотеки: E1, E2, E10, и E11, и 5 пептидов из библиотеки C7C: C1, C5, C9, C13 и C17. При этом C9 и C17 – это один и тот же пептид, по случайности синтезированный дважды под разными номерами.

Обращает на себя внимание тот факт, что не все из этих пептидов продемонстрировали зависимость доза-эффект (см рис. 17). В частности, для пептидов E1, E10 и E11 уровень инфекционности ВИЧ-1 возрастал при уменьшении их концентрации. Возможно, при высоких концентрациях указанных пептидов сказывается ингибирующий эффект органических добавок, используемых для их растворения.

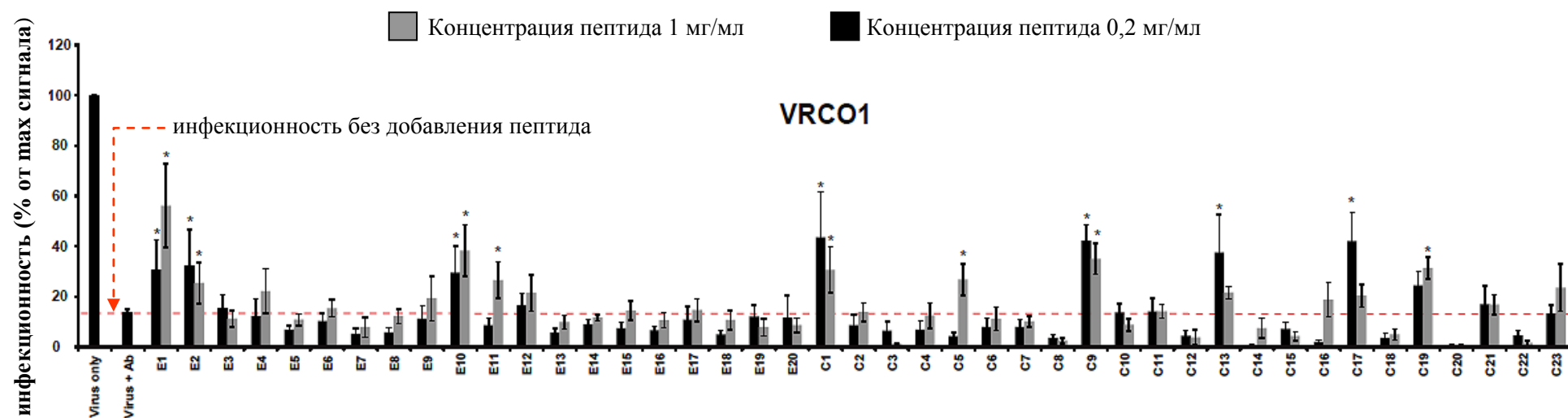


Рис. 17. Ингибирование нейтрализующей активности МКА VRC01 в реакции вируснейтрализации с использованием синтезированных пептидов. За 100 % принято показание люминесценции, производимое вирусом без добавления антител и пептидов. Красной пунктирной линией обозначен уровень сигнала, производимый вирусом с добавлением антител без пептидов (отрицательный контроль). Символом * обозначены значения люминесценции, статистически значимо отличающиеся от фонового сигнала (t test; $P < 0,05$)

Кроме того, была проверена способность пептидов E1 и C1 (как наиболее перспективных) конкурировать с ВИЧ-1 за связывание с bnAb IgG1b12 для того чтобы убедиться, что данные пептиды специфически подавляют нейтрализующую активность антитела VRC01. С обоими антителами было проведено 6 независимых экспериментов по заражению клеток смесью вирус-антитело-пептид. Как видно на рис. 18, в реакции с использованием VRC01 происходило восстановление инфекционности вируса, при этом в экспериментах с b12 уровень инфекционности незначительно отличался от значения отрицательного контроля. Этот результат является убедительным свидетельством того, что пептиды E1 и C1 специфично связываются с bnAb VRC01, блокируя его нейтрализующую активность.

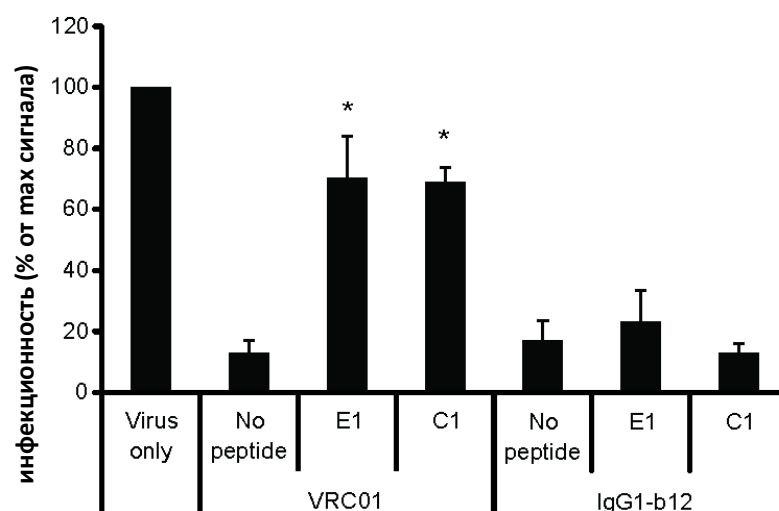


Рис. 18. Реакция конкурентного ингибирования нейтрализующей активности антител VRC01 и IgG1b12 пептидами E1 и C1. За 100 % принято показание люминесценции, производимое вирусом без добавления антител и пептидов. Для оценки фонового сигнала люциферазная активность вируса была измерена при добавлении в реакцию антител VRC01 (IC₉₀ = 6,26 мкг / мл) и IgG1b12 (IC₉₀ = 12,5 мкг/мл), но в отсутствие пептидов. Символом * обозначены значения люминесценции, статистически значимо отличающиеся от отрицательного контроля (*t* test; *P* < 0,05)

Следует отметить, что не всегда пептиды, демонстрировавшие сигнал в дот блоте (находясь в составе бактериофагов), обладали также способностью конкурировать с нативным белком ВИЧ за связывание с антителами. Вероятно, это связано с влиянием окружения из аминокислотных остатков, в контексте которого находится пептид в составе бактериофага. Также данный эффект может быть связан с тем, что не все синтезированные пептиды обладали достаточной растворимостью в буфере, использовавшимся для постановки реакции вируснейтрализации (некоторые пептиды обладали очень низкой растворимостью в стандартных водных растворах).

3.3.5. Модель взаимодействия комплекса VRC01-gp120 и пептидов, входящих в состав селектированных бактериофагов

Как уже отмечалось ранее, нейтрализующее антитело широкого спектра действия VRC01 связывается с участком gp120 в области сайта связывания с CD4 рецептором (CD4bs). Чтобы подтвердить возможность связывания отобранных пептидов с антителом VCR01 в районе взаимодействия с CD4bs были построены компьютерные модели с использованием метода молекулярного докинга. В этих моделях проверялась возможность перекрывания фрагментов пептидов, продемонстрировавших в конкурентном ингибировании наилучшие результаты, с комплексом VRC01-gp120. Оказалось, что фрагменты пептидов E1 (SWPEL), E2 (TAPEL), E10 (TTFDI), и E11 (SIADL) способны имитировать район 365-371 gp120 без каких-либо стерических препятствий (рис. 19). Аналогичную модель для пептидов из библиотеки Ph.D-C7C построить не удалось, поскольку не было найдено гомологии между пептидами из данной библиотеки и эпитопом, узнаваемым bnAb VRC01. По всей видимости, взаимодействие кольцевых пептидов с VRC01 происходит иным образом.

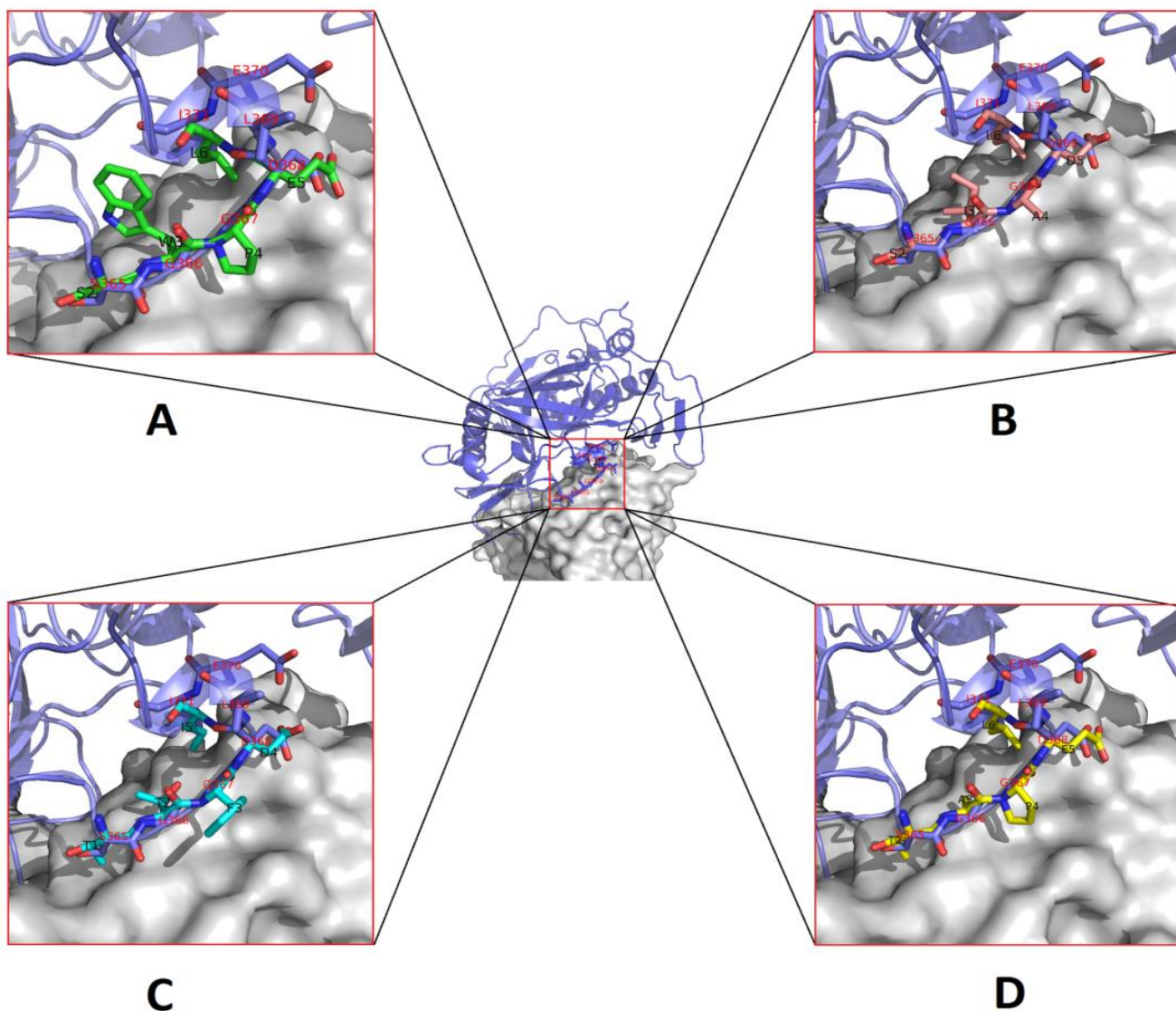


Рис. 19. Модели перекрытия между фрагментами пептидов, продемонстрировавших способность ингибировать нейтрализующую активность bnAb VRC01, и комплексом VRC01-grp120. Антитело изображено в виде поверхности (серый цвет), кристаллическая структура гликопротеина gp120 выделена синим цветом, аминокислотные остатки, входящие в его состав и образующие мотив SGGLEI, обозначены красным, фрагменты пептидов E1 (SWPEL), E2 (TAPEL), E10 (TTFDI) и E11 (SIADL) изображены в виде цветных толстых линий (A, B, C и D соответственно)

Таким образом, полученные практические результаты указывают на то, что найденные пептиды по крайней мере частично имитируют фрагмент CD4-связывающий петли.

3.3.6. Проверка нейтрализующей активности сывороток животных, иммунизированных препаратами бактериофагов

Бактериофаги, экспонирующие пептиды, которые продемонстрировали наилучшие результаты в реакции конкурентного ингибирования, были использованы для иммунизации кроликов. Иммунизацию проводили следующими фаговыми клонами:

№ 5 VRC01 (несет пептид E1: VSWPELYKWTWS)

№ 3 VRC01 (несет пептид E2: ITAPELYAWFGS)

№ 7 c7c VRC01 (несет пептид C1: CSWTLLGYC)

№ 10 c7c VRC01 (несет пептид C9: CSWNLMGFC)

Две группы кроликов иммунизировали отдельно клонами № 5 VRC01, № 7 C7C, а также смесью бактериофагов: № 5 VCR01+ №3 VRC01+ №7 C7C+№10 C7C. Схема проведения эксперимента аналогична той, которую использовали при оценке нейтрализующей активности сывороток животных, иммунизированных фаготопами для Z13e1. Значения люминесценции, зафиксированные после проведения эксперимента, сведены в таблице 13. В качестве отрицательного контроля, как и в эксперименте с антителом Z13e1, использовались сыворотки кроликов, иммунизированных фагом M13 без пептидной вставки.

Таблица 13

Логарифмированные значения люминесцентных сигналов (указаны в левой колонке), измеренных при постановке реакции вируснейтрализации с использованием различных титров антисывороток кроликов (кратность разведения указана в правой колонке). В таблице представлен список субтипов и штаммов псевдовирусов, использовавшихся в эксперименте

Кролик 7 (ИММУНИЗАЦИЯ фагом № 7 из библиотеки Ph.D-C7, несущим пептид C1)			
LOG₁₀(RLU)	Штамм	Серотип	Разведения сыворотки
4,400585194	B	QH0692.42	нет сыворотки (заражение вирусом)
4,58272388	B	QH0692.42	625000
4,417091928	B	QH0692.42	125000
4,253091661	B	QH0692.42	25000
4,270902978	B	QH0692.42	5000
4,167015746	B	QH0692.42	1000
3,808520608	B	QH0692.42	200
3,955677472	B	QH0692.42	40
4,084306213	B	PVO.4	нет сыворотки (заражение вирусом)

4,203148304	B	PVO.4	625000
4,084336692	B	PVO.4	125000
3,994392636	B	PVO.4	25000
3,946247564	B	PVO.4	5000
3,877117923	B	PVO.4	1000
3,669039662	B	PVO.4	200
3,860590289	B	PVO.4	40
4,156763013	B	RHPA4259.7	нет сыворотки (заражение вирусом)
4,425823402	B	RHPA4259.7	625000
4,222282443	B	RHPA4259.7	125000
4,144935918	B	RHPA4259.7	25000
4,07332936	B	RHPA4259.7	5000
3,980444645	B	RHPA4259.7	1000
3,795496596	B	RHPA4259.7	200
3,998268752	B	RHPA4259.7	40
Кролик 8 (ИММУНИЗАЦИЯ фагом № 5 из библиотеки Ph.D-12, несущим пептид E1)			
LOG₁₀(RLU)	Штамм	Серотип	Разведения сыворотки
3,971181921	A	RUA_007_e3_1	нет сыворотки (заражение вирусом)
4,029467914	A	RUA_007_e3_1	625000
3,940891586	A	RUA_007_e3_1	125000
3,886384661	A	RUA_007_e3_1	25000
3,801020883	A	RUA_007_e3_1	5000
3,698672765	A	RUA_007_e3_1	1000
3,51820579	A	RUA_007_e3_1	200
3,739803637	A	RUA_007_e3_1	40
3,856165885	AG	RUA_003aT8_2	нет сыворотки (заражение вирусом)
3,856165885	AG	RUA_003aT8_2	625000
3,94149982	AG	RUA_003aT8_2	125000
3,464738372	AG	RUA_003aT8_2	25000
3,473871283	AG	RUA_003aT8_2	5000
3,643455938	AG	RUA_003aT8_2	1000
3,622398723	AG	RUA_003aT8_2	200
3,461999251	AG	RUA_003aT8_2	40
Кролик 6 (ИММУНИЗАЦИЯ смесью фагов, несущих пептиды E1, E2, C1, C9)			
LOG₁₀(RLU)	Штамм	Серотип	Разведения сыворотки
4,371325801	B	QH0692.42	нет сыворотки (заражение вирусом)
4,409688705	B	QH0692.42	625000
4,400306383	B	QH0692.42	125000
4,34128066	B	QH0692.42	25000
4,42034168	B	QH0692.42	5000
4,316850836	B	QH0692.42	1000
4,107089046	B	QH0692.42	200
4,036924394	B	QH0692.42	40
4,086110712	B	PVO.4	нет сыворотки (заражение вирусом)
4,255416534	B	PVO.4	625000
4,197068577	B	PVO.4	125000
4,21326888	B	PVO.4	25000

4,152253338	B	PVO.4	5000
4,098549028	B	PVO.4	1000
3,945660803	B	PVO.4	200
3,926440635	B	PVO.4	40
4,226084046	B	RHPA4259.7	нет сыворотки (заражение вирусом)
4,399586935	B	RHPA4259.7	625000
4,314623108	B	RHPA4259.7	125000
4,293088332	B	RHPA4259.7	25000
4,261000283	B	RHPA4259.7	5000
4,25585021	B	RHPA4259.7	1000
4,102343421	B	RHPA4259.7	200
3,981675493	B	RHPA4259.7	40
Кролик 5 (ИММУНИЗАЦИЯ смесью фагов, несущих пептиды E1, E2, C1, C9)			
LOG₁₀(RLU)	Штамм	Серотип	Разведения сыворотки
4,120243118	B	QH0692.42	нет сыворотки (заражение вирусом)
4,112142189	B	QH0692.42	625000
4,08580593	B	QH0692.42	125000
3,942416514	B	QH0692.42	25000
3,719655903	B	QH0692.42	5000
3,691178037	B	QH0692.42	1000
3,412908773	B	QH0692.42	200
3,860172804	B	QH0692.42	40
3,908762067	A	RUA_007_e3_1	нет сыворотки (заражение вирусом)
3,96667434	A	RUA_007_e3_1	625000
3,931721845	A	RUA_007_e3_1	125000
3,87102054	A	RUA_007_e3_1	25000
3,817746382	A	RUA_007_e3_1	5000
3,693185886	A	RUA_007_e3_1	1000
3,558665688	A	RUA_007_e3_1	200
3,654178841	A	RUA_007_e3_1	40
4,015276399	B	RHPA4259.7	нет сыворотки (заражение вирусом)
4,060228542	B	RHPA4259.7	625000
3,987181453	B	RHPA4259.7	125000
3,889024647	B	RHPA4259.7	25000
3,903861513	B	RHPA4259.7	5000
3,677936009	B	RHPA4259.7	1000
3,587490354	B	RHPA4259.7	200
3,856607811	B	RHPA4259.7	40
3,893622241	AG	RUA_003aT8_2	нет сыворотки (заражение вирусом)
3,995936165	AG	RUA_003aT8_2	625000
3,986148488	AG	RUA_003aT8_2	125000
3,89093186	AG	RUA_003aT8_2	25000
3,893705934	AG	RUA_003aT8_2	5000
3,596577697	AG	RUA_003aT8_2	1000
3,543257902	AG	RUA_003aT8_2	200
3,52746072	AG	RUA_003aT8_2	40

Полученные данные обрабатывались с помощью многофакторного регрессионного анализа по аналогии со способом, описанным в главе 3.1.3. В данном случае индивидуальные особенности животных оказывали еще большее влияние на нейтрализующую активность сывороток (рис. 20).

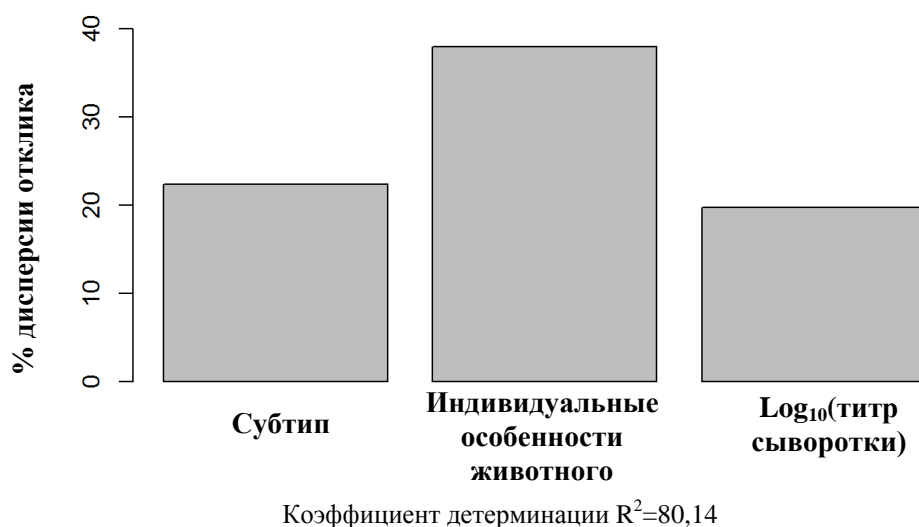


Рис. 20. Относительная значимость факторов в модели, построенной на основе данных анализа сывороток от кроликов №№ 5,6,7,8 (иммунизированы фаготопами, отобранными с использованием bnAb VRC01). На рисунке представлены только независимые (нескоррелированные) факторы

Тем не менее, было также зафиксировано достоверное дозозависимое снижение инфекционности псевдовиральных частиц при использовании опытных сывороток по сравнению с контрольными.

Таким образом, можно сделать вывод, что в результате проведения экспериментов по скринингу пептидных 12-мерной и 7-мерной циклической фаговых библиотек против антител VRC01 был найден ряд фаготопов, проявляющие антигенную активность, имитирующую нативный эпитоп исследуемого антитела.

В пептидах, отобранных при скрининге 12-мерной библиотеки, выявлен консенсусный мотив вида **UOxxJUxxWxxx**, где **x** – любой аминокислотный остаток, **U** – гидрофобный неароматический остаток (**L**, **I** либо **V**), **O** – **S** либо **T**, **J** – отрицательно заряженный (**D** либо **E**). Компьютерное моделирование перекрытия пептидов E1, E2, E10 и E11 из полученной выборки с комплексом VRC01-gp120 показало, что фрагменты E1 (SWPEL), E2 (TAPEL), E10 (TTFDI), и E11 (SIADL) способны имитировать район 365-371 gp120 без каких-либо стерических препятствий, что подтверждает адекватность полученных экспериментальных данных.

Анализ иммуногенности пептидов E1 и E2 из 12-мерной библиотеки с помощью тестов по вируснейтрализации позволил получить дополнительное подтверждение способности полученных фаготопов имитировать антигенную детерминанту МКА VRC01.

В пептидах, отобранных из 7-мерной циклической библиотеки, консенсусный мотив выявлен не был. Соответствующие компьютерные модели перекрывания с комплексом VRC01-gp120 построить также не удалось. Тем не менее, некоторые пептиды из этой библиотеки продемонстрировали способность взаимодействовать с bnAb VRC01 в конкурентном анализе. Кроме того, было показано, что сыворотки лабораторных животных, иммунизированных фаготопами, которые содержали данные пептиды, обладают нейтрализующей активностью в отношении псевдовирусов ВИЧ-1. Данные факты указывают на то, что перечисленные пептиды проявляют свойства мимотопов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы с использованием трех типов фаговых библиотек пептидов была получена коллекция фаготопов, экспонирующих на своей поверхности пептиды-имитаторы эпитопов антител широкого спектра действия Z13e1, IgG1b12 и VRC01, способных нейтрализовать ВИЧ-1 различных штаммов.

Следует отметить, что пептиды-имитаторы эпитопов, узнаваемых МКА VRC01, получены впервые. Специфическая активность отобранных пептидов была изучена как в составе фаговых частиц, так и в свободном виде. С использованием псевдовиральных частиц проведена оценка их способности конкурировать с эпитопом ВИЧ-1 за связывание с VRC01 и IgG1b12 в реакции вируснейтрализации.

Для изучения иммуногенности пептидов в составе фаговых частиц последние были наработаны в препаративных количествах для иммунизации лабораторных животных и получения сывороток с целью изучения их вируснейтрализующей активности. Было показано, что сыворотки кроликов, иммунизированных смесью бактериофагов, способны нейтрализовать псевдотипированные вирусы, полученные на основе ВИЧ-1 субтипов А, В, АГ. В результате проведения этих исследований нам удалось продемонстрировать иммунологическую имитацию линейными пептидами конформационных антигенных детерминант, в данном случае – эпитопов ВИЧ-1, индуцирующих наработку антител широкого спектра вируснейтрализующей активности.

Полученные в работе пептиды-имитаторы являются тем материалом, на основе которого можно рассчитывать и конструировать искусственные иммуногены для создания профилактической вакцины против ВИЧ-1. Мы полагаем, что полученные в данной работе результаты могут быть полезными при создании средств иммунопрофилактики в отношении других вирусных патогенов.

Результаты настоящей работы имеют и фундаментальное значение. Были получены новые знания в области белок-белковых взаимодействий, идентифицированы новые мотивы в линейных пептидах, обеспечивающие взаимодействие нейтрализующих моноклональных антител с ВИЧ-1.

Выводы

1. С помощью аффинной селекции из фаговых библиотек отобраны клоны фагов, которые содержат пептиды, специфично взаимодействующие с моноклональными антителами Z13e1, IgG1b12 и VRC01, обладающими широким спектром вируснейтрализующей активности в отношении ВИЧ-1.
2. Определены структуры рандомизированных пептидов, экспонированных в составе поверхностных белков отобранных фагов. Идентифицированы консенсусные мотивы в аминокислотных последовательностях пептидов, связывающихся с антителами VRC01 и Z13e1.
3. С помощью иммуноблотинга подтверждена специфичность взаимодействия пептидов, выявленных в составе отобранных фагов, с антителами Z13e1, IgG1b12 и VRC01.
4. Выявлены пептиды, способные конкурировать с ВИЧ-1 (NL4-3) за связывание с антителами IgG1b12 и VRC01 в реакции вируснейтрализации.
5. Анализ, проведенный при помощи программного обеспечения pdMap с использованием трехмерной модели комплекса gp120-VRC01-пептид, показал, что отобранные пептиды-имитаторы по крайней мере частично имитируют фрагмент CD4-связывающей петли.
6. Антисыворотки к фагам, содержащим идентифицированные пептиды-миметики эпитопов, узнаваемых антителами Z13e1, IgG1b12 и VRC01, проявляют нейтрализующую активность в отношении псевдовирусов, полученных на основе ВИЧ-1 субтипов A, B и AG.

Список литературы

1. Ильичев А.А., Миненкова О.О., Татьков С.И., Карпышев Н.Н., Ерошкин А.М., Петренко В.А., Сандахчиев Л.С. Получение жизнеспособного варианта фага M13 со встроенным чужеродным пептидом в основной белок оболочки // Доклады Академии наук СССР. – 1989. – Т. 307. – № 2. – С. 481-483.
2. Ильичев А.А., Миненкова О.О., Татьков С.И., Карпышев Н.Н., Ерошкин А.М., Офицеров В.И., Акименко З.А., Петренко В.А., Сандахчиев Л.С. Использование нитчатого бактериофага M13 для белковой инженерии // Молекулярная биология. – 1990. – Т. 24. – № 2. – С. 530-535.
3. Кищенко Г.П., Миненкова О.О., Ильичев А.А., Груздев А.Д., Петренко В.А. Изучение структуры вирионов фага M13, содержащих молекулы химерных В-белков // Молекулярная биология. – 1991. – Т. 25. – № 6. – С. 1497-1503.
4. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. В.В. Зверева и М.Н. Бойченко. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 448 с.
5. Миненкова О.О., Ильичев А.А., Кищенко Г.П., Ильичева Т.Н., Хрипин Ю.Л., Орешкова С.Ф., Петренко В.А. Получение специфического иммуногена на основе бактериофага M13 // Молекулярная биология. – 1993. – Т. 27. – № 3. – С. 561-568.
6. Николенко Г.Н., Котелкин А.Т., Орешкова С.Ф., Ильичев А.А. Механизмы лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к нуклеозидным и нуклеотидным ингибиторам обратной транскриптазы // Молекулярная биология. – 2011. – Т. 45. – № 1. – С. 108-126.
7. Туманова О.Ю., Кувшинов В.Н., Ильичев А.А., Некрасов Б.Г., Иванисенко В.А., Козлов А.П., Сандахчиев Л.С. Локализация конформационного эпитопа гликопротеина gp120 ВИЧ-1, узнаваемого вируснейтрализующими моноклональными антителами 2G12 // Молекулярная биология. – 2002. – Т. 36. – № 4. – С. 657-663.
8. Туманова О.Ю., Кувшинов В.Н., Орловская И.А., Проняева Т.Р., Покровский А.Г., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С. Иммуногенные свойства пептидов имитаторов эпитопа белка gp41 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), узнаваемого нейтрализующим антителом 2F5 // Молекулярная биология. – 2003. – Т. 37. – № 3. – С. 556-560.
9. Туманова О.Ю., Кувшинов В.Н., Азаев М.Ш., Машарский А.Э., Климов А.П., Козлов Н.А., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С. Получение пептидов-имитаторов эпитопа белка gp41 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), узнаваемого вируснейтрализующими антителами 2F5 // Молекулярная биология. – 2001. – Т. 35. – № 1. – С. 146-151.
10. amfAR, The Foundation for AIDS Research. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.amfar.org/worldwide-aids-stats/> (Дата обращения: 15.01.2015).
11. Balazs A.B., West A.P., Jr. Antibody gene transfer for HIV immunoprophylaxis // Nature Immunology. – 2013. – Vol. 14. – N 1. – P. 1-5.

12. Barbas Iii C.F., Collet T.A., Amberg W., Roben P., Binley J.M., Hoekstra D., Cababa D., Jones T.M., Williamson R.A., Pilkington G.R., Haigwood N.L., Cabezas E., Satterthwait A.C., Sanz I., Burton D.R. Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries // *Journal of Molecular Biology.* – 1993. – Vol. 230. – N 3. – P. 812-823.
13. Barre-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) // *Science.* – 1983. – Vol. 220. – N 4599. – P. 868-871.
14. Bazhan S.I., Karpenko L.I., Ilyicheva T.N., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Antonets D.V., Ilyichev A.A. Rational design based synthetic polyepitope DNA vaccine for eliciting HIV-specific CD8⁺ T cell responses // *Molecular Immunology.* – 2010. – Vol. 47. – N 7-8. – P. 1507-1515.
15. Beghetto E., Gargano N. Lambda-display: a powerful tool for antigen discovery // *Molecules.* – 2011. – Vol. 16. – N 4. – P. 3089-3105.
16. Belyakov I.M., Ahlers J.D. Simultaneous approach using systemic, mucosal and transcutaneous routes of immunization for development of protective HIV-1 vaccines // *Current Medicinal Chemistry.* – 2011. – Vol. 18. – N 26. – P. 3953-3962.
17. Benjelloun F., Lawrence P., Verrier B., Genin C., Paul S. Role of human immunodeficiency virus type 1 envelope structure in the induction of broadly neutralizing antibodies // *Journal of Virology.* – 2012. – Vol. 86. – N 24. – P. 13152-13163.
18. Berkhout B., Sanders R.W. Gene therapy as a vaccine for HIV-1 // *Expert Opinion on Biological Therapy.* – 2012. – Vol. 12. – N 10. – P. 1315-1321.
19. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank // *Nucleic Acids Research.* – 2000. – Vol. 28. – N 1. – P. 235-242.
20. Binley J.M., Wrin T., Korber B., Zwick M.B., Wang M., Chappey C., Stiegler G., Kunert R., Zolla-Pazner S., Katinger H., Petropoulos C.J., Burton D.R. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies // *Journal of Virology.* – 2004. – Vol. 78. – N 23. – P. 13232-13252.
21. Binley J.M., Lybarger E.A., Crooks E.T., Seaman M.S., Gray E., Davis K.L., Decker J.M., Wycuff D., Harris L., Hawkins N., Wood B., Nathe C., Richman D., Tomaras G.D., Bibollet-Ruche F., Robinson J.E., Morris L., Shaw G.M., Montefiori D.C., Mascola J.R. Profiling the specificity of neutralizing antibodies in a large panel of plasmas from patients chronically infected with human immunodeficiency virus type 1 subtypes B and C // *Journal of Virology.* – 2008. – Vol. 82. – N 23. – P. 11651-11668.
22. Blattner C., Lee J., Sliepen K., Derking R., Falkowska E., delaPeña A., Cupo A., Julien J.P., vanGils M., Lee P.S., Peng W., Paulson J.C., Poignard P., Burton D.R., Moore J.P., Sanders R.W., Wilson I.A., Ward A.B. Structural delineation of a quaternary, cleavage-dependent epitope at the gp41-gp120 interface on intact HIV-1 env trimers // *Immunity.* – 2014. – Vol. 40. – N 5. – P. 669-680.

23. Bonnycastle L.L., Mehroke J.S., Rashed M., Gong X., Scott J.K. Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage // *Journal of Molecular Biology*. – 1996. – Vol. 258. – N 5. – P. 747-762.
24. Bonsignori M., Montefiori D.C., Wu X., Chen X., Hwang K.K., Tsao C.Y., Kozink D.M., Parks R.J., Tomaras G.D., Crump J.A., Kapiga S.H., Sam N.E., Kwong P.D., Kepler T.B., Liao H.X., Mascola J.R., Haynes B.F. Two distinct broadly neutralizing antibody specificities of different clonal lineages in a single HIV-1-infected donor: Implications for vaccine design // *Journal of Virology*. – 2012. – Vol. 86. – N 8. – P. 4688-4692.
25. Bonsignori M., Hwang K.K., Chen X., Tsao C.Y., Morris L., Gray E., Marshall D.J., Crump J.A., Kapiga S.H., Sam N.E., Sinangil F., Pancera M., Yongping Y., Zhang B., Zhu J., Kwong P.D., O'Dell S., Mascola J.R., Wu L., Nabel G.J., Phogat S., Seaman M.S., Whitesides J.F., Moody M.A., Kelsoe G., Yang X., Sodroski J., Shaw G.M., Montefiori D.C., Kepler T.B., Tomaras G.D., Alam S.M., Liao H.X., Haynes B.F. Analysis of a clonal lineage of HIV-1 envelope V2/V3 conformational epitope-specific broadly neutralizing antibodies and their inferred unmutated common ancestors // *Journal of Virology*. – 2011. – Vol. 85. – N 19. – P. 9998-10009.
26. Boots L.J., McKenna P.M., Arnold B.A., Keller P.M., Gorny M.K., Zolla-Pazner S., Robinson J.E., Conley A.J. Anti-human immunodeficiency virus type 1 human monoclonal antibodies that bind discontinuous epitopes in the viral glycoproteins can identify mimotopes from recombinant phage peptide display libraries // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 1997. – Vol. 13. – N 18. – P. 1549-1559.
27. Brunel F.M., Zwick M.B., Cardoso R.M., Nelson J.D., Wilson I.A., Burton D.R., Dawson P.E. Structure-function analysis of the epitope for 4E10, a broadly neutralizing human immunodeficiency virus type 1 antibody // *Journal of Virology*. – 2006. – Vol. 80. – N 4. – P. 1680-1687.
28. Buchacher A., Predl R., Strutzenberger K., Steinfellner W., Trkola A., Purtscher M., Gruber G., Tauer C., Steindl F., Jungbauer A., Katinger H. Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins: Electrofusioin and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 1994. – Vol. 10. – N 4. – P. 359-369.
29. Buchbinder S.P., Mehrotra D.V., Duerr A., Fitzgerald D.W., Mogg R., Li D., Gilbert P.B., Lama J.R., Marmor M., del Rio C., McElrath M.J., Casimiro D.R., Gottesdiener K.M., Chodakewitz J.A., Corey L., Robertson M.N. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial // *The Lancet*. – 2008. – Vol. 372. – N 9653. – P. 1881-1893.
30. Burton D.R., Poignard P., Stanfield R.L., Wilson I.A. Broadly neutralizing antibodies present new prospects to counter highly antigenically diverse viruses // *Science*. – 2012. – Vol. 337. – N 6091. – P. 183-186.
31. Burton D.R., Barbas Iii C.F., Persson M.A.A., Koenig S., Changcr 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 // *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America. – 1991. – Vol. 88. – N 22. – P. 10134-10137.
32. Burton D.R., Pyati J., Koduri R., Sharp S.J., Thornton G.B., Parren P.W.H.I., Sawyer L.S.W., Hendry R.M., Dunlop N., Nara P.L., Lamacchia M., Garratty E., Stiehm E.R., Bryson Y.J., Cao Y., Moore J.P., Ho D.D., Barbas Iii C.F. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody // *Science*. – 1994. – Vol. 266. – N 5187. – P. 1024-1027.
 33. Cardoso R.M.F., Brunel F.M., Ferguson S., Zwick M., Burton D.R., Dawson P.E., Wilson I.A. Structural Basis of Enhanced Binding of Extended and Helically Constrained Peptide Epitopes of the Broadly Neutralizing HIV-1 Antibody 4E10 // *Journal of Molecular Biology*. – 2007. – Vol. 365. – N 5. – P. 1533-1544.
 34. Chen X., Scala G., Quinto I., Liu W., Chun T.W., Shawn Justement J., Cohen O.J., Vancott T.C., Iwanicki M., Lewis M.G., Greenhouse J., Barry T., Venzon D., Fauci A.S. Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage-displayed HIV-1 epitopes // *Nature Medicine*. – 2001. – Vol. 7. – N 11. – P. 1225-1231.
 35. Chuang G.Y., Acharya P., Schmidt S.D., Yang Y., Louder M.K., Zhou T., Kwon Y.D., Pancera M., Bailer R.T., Doria-Rose N.A., Nussenzweig M.C., Mascola J.R., Kwong P.D., Georgiev I.S. Residue-level prediction of HIV-1 antibody epitopes based on neutralization of diverse viral strains // *Journal of Virology*. – 2013. – Vol. 87. – N 18. – P. 10047-10058.
 36. Chun T.W., Murray D., Justement J.S., Blazkova J., Hallahan C.W., Fankuchen O., Gittens K., Benko E., Kovacs C., Moir S., Fauci A.S. Broadly neutralizing antibodies suppress HIV in the persistent viral reservoir // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – Vol. 111. – N 36. – P. 13151-13156.
 37. Conley A.J., Kessler Ii J.A., Boots L.J., Tung J.S., Arnold B.A., Keller P.M., Shaw A.R., Emini E.A. Neutralization of divergent human immunodeficiency virus type 1 variants and primary isolates by IAM-41-2F5, an anti-gp41 human monoclonal antibody // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1994. – Vol. 91. – N 8. – P. 3348-3352.
 38. Corti D., Langedijk J.P.M., Hinz A., Seaman M.S., Vanzetta F., Fernandez-Rodriguez B.M., Silacci C., Pinna D., Jarrossay D., Balla-Jhagjhoorsingh 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 Á., 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. – Vol. 5. – N 1. DOI: 10.1371/journal.pone.0008805.
 39. Delhalle S., Schmit J.C., Chevigne A. Phages and HIV-1: From Display to Interplay // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2012. – Vol. 13. – N 4. – P. 4727-4794.
 40. Denisova G., Stern B., Raviv D., Zwickel J., Smorodinsky N.I., Gershoni J.M. Humoral immune response to immunocomplexed HIV envelope glycoprotein 120 // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 1996. – Vol. 12. – N 10. – P. 901-909.

41. 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 // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81. – N 12. – P. 6548-6562.
42. Dieltjens T., Heyndrickx L., Willems B., Gray E., Van Nieuwenhove L., Grunning K., Vanham G., Janssens W. Evolution of antibody landscape and viral envelope escape in an HIV-1 CRF02_AG infected patient with 4E10-like antibodies // *Retrovirology*. – 2009. – Vol. 6. DOI: 10.1186/1742-4690-6-113.
43. Dieltjens T., Willems B., Coppens S., Van Nieuwenhove L., Humbert M., Dietrich U., Heyndrickx L., Vanham G., Janssens W. Unravelling the antigenic landscape of the HIV-1 subtype A envelope of an individual with broad cross-neutralizing antibodies using phage display peptide libraries // *Journal of Virological Methods*. – 2010. – Vol. 169. – N 1. – P. 95-102.
44. Diskin R., Scheid J.F., Marcovecchio P.M., West Jr A.P., Klein F., Gao H., Gnanapragasam P.N.P., Abadir A., Seaman M.S., Nussenzweig M.C., Bjorkman P.J. Increasing the potency and breadth of an HIV antibody by using structure-based rational design // *Science*. – 2011. – Vol. 334. – N 6060. – P. 1289-1293.
45. Doores K.J., Fulton Z., Hong V., Patel M.K., Scanlan C.N., Wormald M.R., Finn M.G., Burton D.R., Wilson I.A., Davis B.G. A nonself sugar mimic of the HIV glycan shield shows enhanced antigenicity // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Vol. 107. – N 40. – P. 17107-17112.
46. Dorgham K., Dogan I., Bitton N., Parizot C., Cardona V., Debre P., Hartley O., Gorochoff G. Immunogenicity of HIV type 1 gp120 CD4 binding site phage mimotopes // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2005. – Vol. 21. – N 1. – P. 82-92.
47. 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 // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83. – N 1. – P. 188-199.
48. Dorr P., Westby M., Dobbs S., Griffin P., Irvine B., Macartney M., Mori J., Rickett G., Smith-Burchnell C., Napier C., Webster R., Armour D., Price D., Stammen B., Wood A., Perros M. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2005. – Vol. 49. – N 11. – P. 4721-4732.
49. Enshell-Seijffers D., Smelyanski L., Vardinon N., Yust I., Gershoni J.M. Dissection of the humoral immune response toward an immunodominant epitope of HIV: A model for the analysis of antibody diversity in HIV+ individuals // *FASEB Journal*. – 2001. – Vol. 15. – N 12. – P. 2112-2120.
50. Enshell-Seijffers D., Denisov D., Groisman B., Smelyanski L., Meyuhass R., Gross G., Denisova G., Gershoni J.M. The mapping and reconstitution of a conformational

- discontinuous B-cell epitope of HIV-1 // *Journal of Molecular Biology*. – 2003. – Vol. 334. – N 1. – P. 87-101.
51. Eroshkin A.M., LeBlanc A., Weekes D., Post K., Li Z., Rajput A., Butera S.T., Burton D.R., Godzik A. bNAber: database of broadly neutralizing HIV antibodies // *Nucleic Acids Reseach*. – 2014. – Vol. 42. – Database issue. – P. D1133-1139.
 52. Esparza J. A brief history of the global effort to develop a preventive HIV vaccine // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31. – N 35. – P. 3502-3518.
 53. Euler Z., Bunnik E.M., Burger J.A., Boeser-Nunnink B.D.M., Grijzen M.L., Prins J.M., Schuitemaker H. Activity of broadly neutralizing antibodies, including PG9, PG16, and VRC01, against recently transmitted subtype B HIV-1 variants from early and late in the epidemic // *Journal of Virology*. – 2011. – Vol. 85. – N 14. – P. 7236-7245.
 54. Falkowska E., Le K.M., Ramos A., Doores K.J., Lee J., Blattner C., Ramirez A., Derking R., vanGils M.J., Liang C.H., McBride R., von Bredow B., Shivatare S.S., Wu C.Y., Chan-Hui P.Y., Liu Y., Feizi T., Zwick M.B., Koff W.C., Seaman M.S., Swiderek K., Moore J.P., Evans D., Paulson J.C., Wong C.H., Ward A.B., Wilson I.A., Sanders R.W., Poignard P., Burton D.R. Broadly neutralizing HIV antibodies define a glycan-dependent epitope on the prefusion conformation of gp41 on cleaved envelope trimers // *Immunity*. – 2014. – Vol. 40. – N 5. – P. 657-668.
 55. Ferrantelli F., Rasmussen R.A., Hofmann-Lehmann R., Xu W., McClure H.M., Ruprecht R.M. Do not underestimate the power of antibodies – Lessons from adoptive transfer of antibodies against HIV // *Vaccine*. – 2002. – Vol. 20. – N SUPPL. 4. – P. A61-A65.
 56. Ferrer M., Sullivan B.J., Godbout K.L., Burke E., Stump H.S., Godoy J., Golden A., Profy A.T., Van Schravendijk M.R. Structural and functional characterization of an epitope in the conserved C-terminal region of HIV-1 gp120 // *Journal of Peptide Research*. – 1999. – Vol. 54. – N 1. – P. 32-42.
 57. Flynn N.M., Forthal D.N., Harro C.D., Judson F.N., Mayer K.H., Para M.F., Gurwith M. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection // *Journal of Infectious Diseases*. – 2005. – Vol. 191. – N 5. – P. 654-665.
 58. Folgori A., Tafi R., Meola A., Felici F., Galfre G., Cortese R., Monaci P., Nicosia A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera // *EMBO Journal*. – 1994. – Vol. 13. – N 9. – P. 2236-2243.
 59. 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. – Vol. 8. – N 8. DOI: 10.1371/journal.pone.0072054.
 60. Gazarian K.G., Palacios-Rodriguez Y., Gazarian T.G., Huerta L. HIV-1 V3 loop crown epitope-focused mimotope selection by patient serum from random phage display libraries: Implications for the epitope structural features // *Molecular Immunology*. – 2013. – Vol. 54. – N 2. – P. 148-156.
 61. Georgiev I.S., Doria-Rose N.A., Zhou T., Kwon Y.D., Staupe R.P., Moquin S., Chuang G.Y., Louder M.K., Schmidt S.D., Altae-Tran H.R., Bailer R.T., McKee K., Nason M., O'Dell S., Ofek G., Pancera M., Srivatsan S., Shapiro L., Connors M., Migueles S.A.,

- Morris L., Nishimura Y., Martin M.A., Mascola J.R., Kwong P.D. Delineating antibody recognition in polyclonal sera from patterns of HIV-1 isolate neutralization // *Science*. – 2013. – Vol. 340. – N 6133. – P. 751-756.
62. Geysen H.M., Rodda S.J., Mason T.J. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant // *Molecular Immunology*. – 1986. – Vol. 23. – N 7. – P. 709-715.
 63. Gilbert P.B., Ackers M.L., Berman P.W., Francis D.P., Popovic V., Hu D.J., Heyward W.L., Sinangil F., Shepherd B.E., Gurwith M. HIV-1 virologic and immunologic progression and initiation of antiretroviral therapy among HIV-1-infected subjects in a trial of the efficacy of recombinant glycoprotein 120 vaccine // *Journal of Infectious Diseases*. – 2005. – Vol. 192. – N 6. – P. 974-983.
 64. Goepfert P., Bansal A. Human Immunodeficiency Virus Vaccines // *Infectious Disease Clinics of North America*. – 2014. DOI: 10.1016/j.idc.2014.08.004.
 65. Gorny M.K., Xu J.Y., Gianakakos V., Karwowska S., Williams C., Sheppard H.W., Hanson C.V., Zolla-Pazner S. Production of site-selected neutralizing human monoclonal antibodies against the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1991. – Vol. 88. – N 8. – P. 3238-3242.
 66. Gottlieb M.S., Schroff R., Schanker H.M., Weisman J.D., Fan P.T., Wolf R.A., Saxon A. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency // *New England Journal of Medicine*. – 1981. – Vol. 305. – N 24. – P. 1425-1431.
 67. Hallenberger S., Bosch V., Angliker H., Shaw E., Klenk H.D., Garten W. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160 // *Nature*. – 1992. – Vol. 360. – N 6402. – P. 358-361.
 68. Haynes B.F., Kelsoe G., Harrison S.C., Kepler T.B. B-cell-lineage immunogen design in vaccine development with HIV-1 as a case study // *Nature Biotechnology*. – 2012. – Vol. 30. – N 5. – P. 423-433.
 69. Haynes B.F., Moody M.A., Alam M., Bonsignori M., Verkoczy L., Ferrari G., Gao F., Tomaras G.D., Liao H.X., Kelsoe G. Progress in HIV-1 vaccine development // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2014. – Vol. 134. – N 1. – P. 3-10.
 70. Hefferon K.L. Broadly neutralizing antibodies and the promise of universal vaccines: Where are we now? // *Immunotherapy*. – 2014. – Vol. 6. – N 1. – P. 51-57.
 71. Hessel A.J., Haigwood N.L. Neutralizing antibodies and control of HIV: Moves and countermoves // *Current HIV/AIDS Reports*. – 2012. – Vol. 9. – N 1. – P. 64-72.
 72. 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., Hengartner N., Bhattacharya T., Mascol J.R., Montefiori D.C. Impact of clade, geography, and age of the epidemic on HIV-1 neutralization by antibodies // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88. – N 21. – P. 12623-12643.

73. Huang J., Ofek G., Laub L., Louder M.K., Doria-Rose N.A., Longo N.S., Imamichi H., Bailer R.T., Chakrabarti B., Sharma S.K., Alam S.M., Wang T., Yang Y., Zhang B., Migueles S.A., Wyatt R., Haynes B.F., Kwong P.D., Mascola J.R., Connors M. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody // *Nature*. – 2012. – Vol. 491. – N 7424. – P. 406-412.
74. Humbert M., Rasmussen R.A., Ong H., Kaiser F.M.P., Hu S.L., Ruprecht R.M. Inducing cross-clade neutralizing antibodies against HIV-1 by immunofocusing // *PLoS One*. – 2008. – Vol. 3. – N 12. DOI: 10.1371/journal.pone.0003937.
75. Humbert M., Antoni S., Brill B., Landersz M., Rodes B., Soriano V., Wintergerst U., Knechten H., Staszewski S., von Laer D., Dittmar M.T., Dietrich U. Mimotopes selected with antibodies from HIV-1-neutralizing long-term non-progressor plasma // *European Journal of Immunology*. – 2007. – Vol. 37. – N 2. – P. 501-515.
76. 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 Letters*. – 1992. – Vol. 301. – N 3. – P. 322-324.
77. Jardine J., Julien J.P., Menis S., Ota T., Kalyuzhnyi O., McGuire A., Sok D., Huang P.S., MacPherson S., Jones M., Nieusma 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. – Vol. 340. – N 6133. – P. 711-716.
78. Javaherian K., Langlois A.J., McDanal C., Ross K.L., Eckler L.I., Jellis C.L., Profy A.T., Rusche J.R., Bolognesi D.P., Putney S.D., Matthews T.J. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1989. – Vol. 86. – N 17. – P. 6768-6772.
79. Jellis C.L., Cradick T.J., Rennert P., Salinas P., Boyd J., Amirault T., Gray G.S. Defining critical residues in the epitope for a hiv-neutralizing monoclonal antibody using phage display and peptide array technologies // *Gene*. – 1993. – Vol. 137. – N 1. – P. 63-68.
80. Julien J.P., Lee J.H., Cupo A., Murin C.D., Derking R., Hoffenberg S., Caulfield M.J., King C.R., Marozsan A.J., Klasse P.J., Sanders R.W., Moore J.P., Wilson I.A., Ward A.B. Asymmetric recognition of the HIV-1 trimer by broadly neutralizing antibody PG9 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – Vol. 110. – N 11. – P. 4351-4356.
81. 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. – Vol. 128. – N 1. – P. 59-65.
82. Kehoe J.W., Kay B.K. Filamentous phage display in the new millennium // *Chemical Reviews*. – 2005. – Vol. 105. – N 11. – P. 4056-4072.
83. Keller P.M., Arnold B.A., Shaw A.R., Tolman R.L., Van Middlesworth F., Bondy S., Rusiecki V.K., Koenig S., Zolla-Pazner S., Conard P., Emini E.A., Conley A.J.

- Identification of HIV vaccine candidate peptides by screening random phage epitope libraries // *Virology*. – 1993. – Vol. 193. – N 2. – P. 709-716.
84. Kim J.H., Excler J.L., Michael N.L. Lessons from the RV144 Thai Phase III HIV-1 Vaccine Trial and the Search for Correlates of Protection // *Annual Review of Medicine*. – 2015. – Vol. 66. – P. 423-427.
 85. Kishchenko G., Batliwala H., Makowski L. Structure of a foreign peptide displayed on the surface of bacteriophage M13 // *Journal of Molecular Biology*. – 1994. – Vol. 241. – N 2. – P. 208-213.
 86. Klein F., Halper-Stromberg A., Horwitz J.A., Gruell H., Scheid J.F., Bournazos S., Mouquet H., Spatz L.A., Diskin R., Abadir A., Zang T., Dorner M., Billerbeck E., Labitt R.N., Gaebler C., Marcovecchio P.M., Incesu R.B., Eisenreich T.R., Bieniasz P.D., Seaman M.S., Bjorkman P.J., Ravetch J.V., Ploss A., Nussenzweig M.C. HIV therapy by a combination of broadly neutralizing antibodies in humanized mice // *Nature*. – 2012. – Vol. 491. – N 7427. – P. 118-122.
 87. Knudsen M.L., Mbewe-Mvula A., Rosario M., Johansson D.X., Kakoulidou M., Bridgeman A., Reyes-Sandoval A., Nicosia A., Ljungberg K., Hanke T., Liljeström P. Superior induction of T cell responses to conserved HIV-1 regions by electroporated alphavirus replicon DNA compared to that with conventional plasmid DNA vaccine // *Journal of Virology*. – 2012. – Vol. 86. – N 8. – P. 4082-4090.
 88. Kovacs J.M., Nkolola J.P., Peng H., Cheung A., Perry J., Miller C.A., Seaman M.S., Barouch D.H., Chen B. HIV-1 envelope trimer elicits more potent neutralizing antibody responses than monomeric gp120 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109. – N 30. – P. 12111-12116.
 89. Kwong P., Mascola J. Human Antibodies that Neutralize HIV-1: Identification, Structures, and B Cell Ontogenies // *Immunity*. – 2012. – Vol. 37. – N 3. – P. 412-425.
 90. Kwong P.D., Mascola J.R., Nabel G.J. Rational design of vaccines to elicit broadly neutralizing antibodies to HIV-1 // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2011. – Vol. 1. – N 1. DOI: 10.1101/cshperspect.a007278.
 91. Kwong P.D., Mascola J.R., Nabel G.J. Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning // *Nature Reviews Immunology*. – 2013. – Vol. 13. – N 9. – P. 693-701.
 92. Levy J.A. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges // *AIDS*. – 2009. – Vol. 23. – N 2. – P. 147-160.
 93. Li M., Gao F., Mascola J.R., Stamatatos L., Polonis V.R., Koutsoukos M., Voss G., Goepfert P., Gilbert P., Greene K.M., Bilska M., Kothe D.L., Salazar-Gonzalez J.F., Wei X., Decker J.M., Hahn B.H., Montefiori D.C. Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79. – N 16. – P. 10108-10125.
 94. Li M., Salazar-Gonzalez J.F., Derdeyn C.A., Morris L., Williamson C., Robinson J.E., Decker J.M., Li Y., Salazar M.G., Polonis V.R., Mlisana K., Karim S.A., Hong K., Greene K.M., Bilska M., Zhou J., Allen S., Chomba E., Mulenga J., Vwalika C., Gao F., Zhang

- M., Korber B.T.M., Hunter E., Hahn B.H., Montefiori D.C. Genetic and neutralization properties of subtype C human immunodeficiency virus type 1 molecular env clones from acute and early heterosexually acquired infections in southern Africa // *Journal of Virology*. – 2006. – Vol. 80. – N 23. – P. 11776-11790.
95. Li Y., Svehla K., Louder M.K., Wycuff D., Phogat S., Tang M., Migueles S.A., Wu X., Phogat A., Shaw G.M., Connors M., Hoxie J., Mascola J.R., Wyatt R. Analysis of neutralization specificities in polyclonal sera derived from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83. – N 2. – P. 1045-1059.
 96. Liu M., Yang G., Wiehe K., Nicely N.I., Vandergrift N.A., Rountree W., Bonsignori M., Munir Alam S., Gao J., Haynes B.F., Kelsoe G. Polyreactivity and autoreactivity among HIV-1 antibodies // *Journal of Virology*. – 2015. – Vol. 89. – N 1. – P. 784-798.
 97. Makowski L. Structural constraints on the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages // *Gene*. – 1993. – Vol. 128. – N 1. – P. 5-11.
 98. Mascola J.R., Montefiori D.C. The role of antibodies in HIV vaccines // *Annual Review of Immunology*. – 2010. – Vol. 28. – P. 413-44.
 99. Mascola J.R., Haynes B.F. HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's pathways // *Immunological Reviews*. – 2013. – Vol. 254. – P. 225-244.
 100. Mascola J.R., D'Souza P., Gilbert P., Hahn B.H., Haigwood N.L., Morris L., Petropoulos C.J., Polonis V.R., Sarzotti M., Montefiori D.C. Recommendations for the design and use of standard virus panels to assess neutralizing antibody responses elicited by candidate human immunodeficiency virus type 1 vaccines // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79. – N 16. – P. 10103-10107.
 101. Matyas G.R., Wiczorek L., Beck Z., Ochsenbauer-Jambor C., Kappes J.C., Michael N.L., Polonis V.R., Alving C.R. Neutralizing antibodies induced by liposomal HIV-1 glycoprotein 41 peptide simultaneously bind to both the 2F5 or 4E10 epitope and lipid epitopes // *AIDS (London, England)*. – 2009. – Vol. 23. – N 16. – P. 2069-2077.
 102. McGuire A.T., Glenn J.A., Lippy A., Stamatatos L. Diverse recombinant HIV-1 envs fail to activate B cells expressing the germline b cell receptors of the broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies PG9 and 447-52D // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88. – N 5. – P. 2645-2657.
 103. McGuire A.T., Hoot S., Dreyer A.M., Lippy A., Stuart A., Cohen K.W., Jardine J., Menis S., Scheid J.F., West A.P., Schief W.R., Stamatatos L. Engineering HIV envelope protein to activate germline B cell receptors of broadly neutralizing anti-CD4 binding site antibodies // *Journal of Experimental Medicine*. – 2013. – Vol. 210. – N 4. – P. 655-663.
 104. McLellan J.S., Pancera M., Carrico C., Gorman J., Julien J.P., Khayat R., Louder R., Pejchal R., Sastry M., Dai K., O'Dell S., Patel N., Shahzad-Ul-Hussan S., Yang Y., Zhang B., Zhou T., Zhu J., Boyington J.C., Chuang G.Y., Diwanji D., Georgiev I., Do Kwon Y., Lee D., Louder M.K., Moquin S., Schmidt S.D., Yang Z.Y., Bonsignori M., Crump J.A., Kapiga S.H., Sam N.E., Haynes B.F., Burton D.R., Koff W.C., Walker L.M., Phogat S., Wyatt R., Orwenyo J., Wang L.X., Arthos J., Bewley C.A., Mascola J.R., Nabel G.J., Schief W.R., Ward A.B., Wilson I.A., Kwong P.D. Structure of HIV-1 gp120 V1/V2

- domain with broadly neutralizing antibody PG9 // *Nature*. – 2011. – Vol. 480. – N 7377. – P. 336-343.
105. McMichael A., Picker L.J., Moore J.P., Burton D.R. Another HIV vaccine failure: where to next? // *Nature Medicine*. – 2013. – Vol. 19. – N 12. – P. 1576-1577.
 106. McMichael A.J., Haynes B.F. Lessons learned from HIV-1 vaccine trials: New priorities and directions // *Nature Immunology*. – 2012. – Vol. 13. – N 5. – P. 423-427.
 107. Menendez A., Chow K.C., Pan O.C.C., Scott J.K. Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing monoclonal antibody 2F5 is multispecific for sequences flanking the DKW core epitope // *Journal of Molecular Biology*. – 2004. – Vol. 338. – N 2. – P. 311-327.
 108. Menendez A., Calarese D.A., Stanfield R.L., Chow K.C., Scanlan C.N., Kunert R., Katinger H., Burton D.R., Wilson I.A., Scott J.K. A peptide inhibitor of HIV-1 neutralizing antibody 2G12 is not a structural mimic of the natural carbohydrate epitope on gp120 // *FASEB Journal*. – 2008. – Vol. 22. – N 5. – P. 1380-1392.
 109. Minenkova O.O., Ilyichev A.A., Kishchenko G.P., Petrenko V.A. Design of specific immunogens using filamentous phage as the carrier // *Gene*. – 1993. – Vol. 128. – N 1. – P. 85-88.
 110. Montefiori D.C. Evaluating neutralizing antibodies against HIV, SIV, and SHIV in luciferase reporter gene assays // *Current Protocols in Immunology*. – 2005. – Chapter 12. – Unit 12.11.
 111. Montefiori D.C., Pantaleo G., Fink L.M., Zhou J.T., Zhou J.Y., Bilska M., Diego Miralles G., Fauci A.S. Neutralizing and infection-enhancing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in long-term nonprogressors // *Journal of Infectious Diseases*. – 1996. – Vol. 173. – N 1. – P. 60-67.
 112. Montefiori D.C., Karnasuta C., Huang Y., Ahmed H., Gilbert P., De Souza M.S., McLinden R., Tovanabutra S., Laurence-Chenine A., Sanders-Buell E., Moody M.A., Bonsignori M., Ochsenbauer C., Kappes J., Tang H., Greene K., Gao H., Labranche C.C., Andrews C., Polonis V.R., Rerks-Ngarm S., Pitisuttithum P., Nitayaphan S., Kaewkungwal J., Self S.G., Berman P.W., Francis D., Sinangil F., Lee C., Tartaglia J., Robb M.L., Haynes B.F., Michael N.L., Kim J.H. Magnitude and breadth of the neutralizing antibody response in the RV144 and Vax003 HIV-1 vaccine efficacy trials // *Journal of Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 206. – N 3. – P. 431-441.
 113. Moore J.P., Trkola A., Korber B., Boots L.J., Kessler I.J., McCutchan F.E., Mascola J., Ho D.D., Robinson J., Conley A.J. A human monoclonal antibody to a complex epitope in the V3 region of gp120 of human immunodeficiency virus type 1 has broad reactivity within and outside clade B // *Journal of Virology*. – 1995. – Vol. 69. – N 1. – P. 122-130.
 114. Morris L., Chen X., Alam M., Tomaras G., Zhang R., Marshall D.J., Chen B., Parks R., Foulger A., Jaeger F., Donathan M., Bilska M., Gray E.S., Karim S.S., Kepler T.B., Whitesides J., Montefiori D., Moody M.A., Liao H.X., Haynes B.F. Isolation of a human anti-HIV gp41 membrane proximal region neutralizing antibody by antigen-specific single B cell sorting // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6. – N 9. DOI: 10.1371/journal.pone.0023532.
 115. Mouquet H., Scharf L., Euler Z., Liu Y., Eden C., Scheid J.F., Halper-Stromberg A., Gnanapragasam P.N.P., Spencer D.I.R., Seaman M.S., Schuitemaker H., Feizi T.,

- Nussenzweig M.C., Bjorkman P.J. Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109. – N 47. – P. E3268-E3277.
116. Mouquet H., Scheid J.F., Zoller M.J., Krogsgaard M., Ott R.G., Shukair S., Artyomov M.N., Pietzsch J., Connors M., Pereyra F., Walker B.D., Ho D.D., Wilson P.C., Seaman M.S., Eisen H.N., Chakraborty A.K., Hope T.J., Ravetch J.V., Wardemann H., Nussenzweig M.C. Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heterologation // *Nature*. – 2010. – Vol. 467. – N 7315. – P. 591-595.
 117. Muster T., Steindl F., Purtscher M., Trkola A., Klima A., Himmeler G., Rucker F., Katinger H. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1 // *Journal of Virology*. – 1993. – Vol. 67. – N 11. – P. 6642-6647.
 118. Nelson J.D., Brunel F.M., Jensen R., Crooks E.T., Cardoso R.M.F., 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 // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81. – N 8. – P. 4033-4043.
 119. Ofek G., McKee K., Yang Y., Yang Z.Y., Skinner J., Guenaga F.J., Wyatt R., Zwick M.B., Nabel G.J., Mascola J.R., Kwong P.D. Relationship between antibody 2F5 neutralization of HIV-1 and hydrophobicity of its heavy chain third complementarity-determining region // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84. – N 6. – P. 2955-2962.
 120. Ozaki D.A., Gao H., Todd C.A., Greene K.M., Montefiori D.C., Sarzotti-Kelsoe M. International technology transfer of a GCLP-compliant HIV-1 neutralizing antibody assay for human clinical trials // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – N 1. DOI: 10.1371/journal.pone.0030963.
 121. Palacios-Rodríguez Y., Gazarian T., Rowley M., Majluf-Cruz A., Gazarian K. Collection of phage-peptide probes for HIV-1 immunodominant loop-epitope // *Journal of Microbiological Methods*. – 2007. – Vol. 68. – N 2. – P. 225-235.
 122. Pande J., Szewczyk M.M., Grover A.K. Phage display: Concept, innovations, applications and future // *Biotechnology Advances*. – 2010. – Vol. 28. – N 6. – P. 849-858.
 123. Pantophlet R., Wang M., Aguilar-Sino R.O., Burton D.R. The human immunodeficiency virus type 1 envelope spike of primary viruses can suppress antibody access to variable regions // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83. – N 4. – P. 1649-1659.
 124. Parren P.W.H.I., Marx P.A., Hessel A.J., Luckay A., Harouse J., Cheng-Mayer C., Moore J.P., Burton D.R. Antibody protects macaques against vaginal challenge with a pathogenic R5 simian/human immunodeficiency virus at serum levels giving complete neutralization in vitro // *Journal of Virology*. – 2001. – Vol. 75. – N 17. – P. 8340-8347.
 125. Pejchal R., Walker L.M., Stanfield R.L., Phogat S.K., Koff W.C., Poignard P., Burton D.R., Wilson I.A. Structure and function of broadly reactive antibody PG16 reveal an H3 subdomain that mediates potent neutralization of HIV-1 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Vol. 107. – N 25. – P. 11483-11488.

126. Pejchal R., Gach J.S., Brunel F.M., Cardoso R.M., Stanfield R.L., Dawson P.E., Burton D.R., Zwick M.B., Wilson I.A. A conformational switch in human immunodeficiency virus gp41 revealed by the structures of overlapping epitopes recognized by neutralizing antibodies // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83. – N 17. – P. 8451-8462.
127. Petrenko V.A. Landscape phage as a molecular recognition interface for detection devices // *Microelectronics Journal*. – 2008. – Vol. 39. – N 2. – P. 202-207.
128. Pietzsch J., Scheid J.F., Mouquet H., Seaman M.S., Broder C.C., Nussenzweig M.C. Anti-gp41 antibodies cloned from HIV-infected patients with broadly neutralizing serologic activity // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84. – N 10. – P. 5032-5042.
129. Pitisuttithum P., Gilbert P., Gurwith M., Heyward W., Martin M., Van Griensven F., Hu D., Tappero J.W., Choopanya K. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand // *Journal of Infectious Diseases*. – 2006. – Vol. 194. – N 12. – P. 1661-1671.
130. Protein Data Bank. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.pdb.org/> (Дата обращения: 15.01.2015).
131. Rakonjac J., Bennett N.J., Spagnuolo J., Gagic D., Russel M. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications // *Current issues in molecular biology*. – 2011. – Vol. 13. – N 2. – P. 51-76.
132. Reed, Muench H. A Simple method of estimating fifty per cent endpoints // *Americal Journal of Epidemiology*. – 1938. – Vol. 27. – N 3. – P. 493-497.
133. Robinson H.L. New hope for an aids vaccine // *Nature Reviews Immunology*. – 2002. – Vol. 2. – N 4. – P. 239-250.
134. Rosario M., Bridgeman A., Quakkelaar E.D., Quigley M.F., Hill B.J., Knudsen M.L., Ammendola V., Ljungberg K., Borthwick N., Im E.J., McMichael A.J., Drijfhout J.W., Greenaway H.Y., Venturi V., Douek D.C., Colloca S., Liljeström P., Nicosia A., Price D.A., Melief C.J.M., Hanke T. Long peptides induce polyfunctional T cells against conserved regions of HIV-1 with superior breadth to single-gene vaccines in macaques // *European Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 40. – N 7. – P. 1973-1984.
135. Ruprecht C.R., Krarup A., Reynell L., Mann A.M., Brandenburg O.F., Berlinger L., Abela I.A., Regoes R.R., Günthard H.F., Rusert P., Trkola A. MPER-specific antibodies induce gp120 shedding and irreversibly neutralize HIV-1 // *Journal of Experimental Medicine*. – 2011. – Vol. 208. – N 3. – P. 439-454.
136. Rusche J.R., Javaherian K., McDanal C., Petro J., Lynn D.L., Grimaile R., Langlois A., Gallo R.C., Arthur L.O., Fischinger P.J., Bolognesi D.P., Putney S.D., Matthews T.J. Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus-infected cells bind a 24-amino acid sequence of the viral envelope, gp120 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1988. – Vol. 85. – N 9. – P. 3198-3202.
137. Sanders R.W., Venturi M., Schiffner L., Kalyanaraman R., Katinger H., Lloyd K.O., Kwong P.D., Moore J.P. The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120 // *Journal of Virology*. – 2002. – Vol. 76. – N 14. – P. 7293-7305.

138. Sandström E., Nilsson C., Hejdeman B., Bråve A., Bratt G., Robb M., Cox J., VanCott T., Marovich M., Stout R., Aboud S., Bakari M., Pallangyo K., Ljungberg K., Moss B., Earl P., Michael N., Birx D., Mhalu F., Wahren B., Biberfeld G., Edbäck U., Engström G., Gudmundsdotter L., Hansson-Pilainen E., Isaguliants M., Karlén K., Kjerrström A., Rollman E., Blomberg P., Ask R., Ekroth S., Eriksson L., Petz I., Reinhard K. Broad immunogenicity of a multigene, multiclade HIV-1 DNA vaccine boosted with heterologous HIV-1 recombinant modified vaccinia virus Ankara // *Journal of Infectious Diseases*. – 2008. – Vol. 198. – N 10. – P. 1482-1490.
139. Sather D.N., Armann J., Ching L.K., Mavrantoni A., Sellhorn G., Caldwell Z., Yu X., Wood B., Self S., Kalams S., Stamatatos L. Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during human immunodeficiency virus type 1 infection // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83. – N 2. – P. 757-769.
140. Scala G., Chen X., Liu W., Telles J.N., Cohen O.J., Vaccarezza M., Igarashi T., Fauci A.S. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera // *Journal of Immunology*. – 1999. – Vol. 162. – N 10. – P. 6155-6161.
141. Scanlan C.N., Pantophlet R., Wormald M.R., Ollmann Saphire E., Stanfield R., Wilson I.A., Katinger H., Dwek R.A., Rudd P.M., Burton D.R. The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120 // *Journal of Virology*. – 2002. – Vol. 76. – N 14. – P. 7306-7321.
142. Scharf L., Scheid J.F., Lee J.H., West A.P., Chen C., Gao H., Gnanapragasam P.N.P., Mares R., Seaman M.S., Ward A.B., Nussenzweig M.C., Bjorkman P.J. Antibody 8ANC195 Reveals a Site of Broad Vulnerability on the HIV-1 Envelope Spike // *Cell Reports*. – 2014. – Vol. 7. – N 3. – P. 785-795.
143. Scheid J.F., Mouquet H., Feldhahn N., Seaman M.S., Velinzon K., Pietzsch J., Ott R.G., Anthony R.M., Zebroski H., Hurley A., Phogat A., Chakrabarti B., Li Y., Connors M., Pereyra F., Walker B.D., Wardemann H., Ho D., Wyatt R.T., Mascola J.R., Ravetch J.V., Nussenzweig M.C. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals // *Nature*. – 2009. – Vol. 458. – N 7238. – P. 636-640.
144. Scheid J.F., Mouquet H., Ueberheide B., Diskin R., Klein F., Oliveira T.Y.K., Pietzsch J., Fenyo D., Abadir A., Velinzon K., Hurley A., Myung S., Boulad F., Poignard P., Burton D.R., Pereyra F., Ho D.D., Walker B.D., Seaman M.S., Bjorkman P.J., Chait B.T., Nussenzweig M.C. Sequence and Structural Convergence of Broad and Potent HIV Antibodies That Mimic CD4 Binding // *Science*. – 2011. – Vol. 333. – N 6049. – P. 1633-1637.
145. Schreiber A., Humbert M., Benz A., Dietrich U. 3D-Epitope-Explorer (3DEX): Localization of conformational epitopes within three-dimensional structures of proteins // *Journal of Computational Chemistry*. – 2005. – Vol. 26. – N 9. – P. 879-887.
146. Scott J.K., Smith G.P. Searching for peptide ligands with an epitope library // *Science*. – 1990. – Vol. 249. – N 4967. – P. 386-390.

147. Sekaly R.P. The failed HIV Merck vaccine study: A step back or a launching point for future vaccine development? // *Journal of Experimental Medicine*. – 2008. – Vol. 205. – N 1. – P. 7-12.
148. Simek M.D., Rida W., Priddy F.H., Pung P., Carrow E., Laufer D.S., Lehrman J.K., Boaz M., Tarragona-Fiol T., Miuro G., Birungi J., Pozniak A., McPhee D.A., Manigart O., Karita E., Inwoley A., Jaoko W., DeHovitz J., Bekker L.G., Pitisuttithum P., Paris R., Walker L.M., Poignard P., Wrin T., Fast P.E., Burton D.R., Koff W.C. Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: Individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83. – N 14. – P. 7337-7348.
149. Sino Biological Inc. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://old.sinobiological.com/Basic-HIV-Human-Immunodeficiency-Virus-Virology-a-6386.html> (Дата обращения: 15.01.2015).
150. Smith G.P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface // *Science*. – 1985. – Vol. 228. – N 4705. – P. 1315-1317.
151. Smith G.P., Scott J.K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage // *Methods in Enzymology*. – 1993. – Vol. 217. – P. 228-257.
152. Smith G.P., Petrenko V.A. Phage display // *Chemical Reviews*. – 1997. – Vol. 97. – N 2. – P. 391-410.
153. Song R.J., Chenine A.L., Rasmussen R.A., Ruprecht C.R., Mirshahidi S., Grisson R.D., Xu W., Whitney J.B., Goins L.M., Ong H., Li P.L., Shai-Kobiler E., Wang T., McCann C.M., Zhang H., Wood C., Kankasa C., Secor W.E., McClure H.M., Strobert E., Else J.G., Ruprecht R.M. Molecularly cloned SHIV-1157ipd3N4: A highly replication-competent, mucosally transmissible R5 simian-human immunodeficiency virus encoding HIV clade C env // *Journal of Virology*. – 2006. – Vol. 80. – N 17. – P. 8729-8738.
154. Stamatatos L., Morris L., Burton D.R., Mascola J.R. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? // *Nature Medicine*. – 2009. – Vol. 15. – N 8. – P. 866-870.
155. Stern B., Denisova G., Buyaner D., Raviv D., Gershoni J.M. Helical epitopes determined by low-stringency antibody screening of a combinatorial peptide library // *FASEB Journal*. – 1997. – Vol. 11. – N 2. – P. 147-153.
156. Summa V., Petrocchi A., Matassa V.G., Gardelli C., Muraglia E., Rowley M., Paz O.G., Laufer R., Monteagudo E., Pace P. 4,5-dihydroxypyrimidine carboxamides and N-alkyl-5-hydroxypyrimidinone carboxamides are potent, selective HIV integrase inhibitors with good pharmacokinetic profiles in preclinical species // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2006. – Vol. 49. – N 23. – P. 6646-6649.
157. Szardenings M. Phage Display of Random Peptide Libraries: Applications, Limits, and Potential // *Journal of Receptors and Signal Transduction*. – 2003. – Vol. 23. – N 4. – P. 307-349.
158. Tozzi V., Bellagamba R., Castiglione F., Amendola A., Ivanovic J., Nicastri E., Libertone R., D'Offizi G., Liuzzi G., Gori C., Forbici F., D'Arrigo R., Bertoli A., Salvatori M.F., Capobianchi M.R., Antinori A., Perno C.F., Narciso P. Plasma HIV RNA decline and

- emergence of drug resistance mutations among patients with multiple virologic failures receiving resistance testing-guided HAART // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2008. – Vol. 24. – N 6. – P. 787-796.
159. Trkola A., Kuster H., Rusert P., Joos B., Fischer M., Leemann C., Manrique A., Huber M., Rehr M., Oxenius A., Weber R., Stiegler G., Vcelar B., Katinger H., Aceto L., Günthard H.F. Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies // *Nature Medicine*. – 2005. – Vol. 11. – N 6. – P. 615-622.
 160. van Gils M.J., Sanders R.W. Broadly neutralizing antibodies against HIV-1: Templates for a vaccine // *Virology*. – 2013. – Vol. 435. – N 1. – P. 46-56.
 161. Verkoczy L., Chen Y., Bouton-Verville H., Zhang J., Diaz M., Hutchinson J., Ouyang Y.B., Alam S.M., Holl T.M., Hwang K.K., Kelsoe G., Haynes B.F. Rescue of HIV-1 broad neutralizing antibody-expressing B cells in 2F5 V H X V L knockin mice reveals multiple tolerance controls // *Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 187. – N 7. – P. 3785-3797.
 162. 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 Pathogens*. – 2010. – Vol. 6. – N 8. – P. 11-12. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001028.
 163. 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., Lehrman J.K., Priddy F.H., Olsen O.A., Frey S.M., Hammond P.W., 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. – Vol. 326. – N 5950. – P. 285-289.
 164. Walker L.M., Huber M., Doores K.J., Falkowska E., Pejchal R., Julien J.P., Wang S.K., Ramos A., Chan-Hui P.Y., Moyle M., Mitcham J.L., Hammond P.W., Olsen O.A., Phung P., Fling S., Wong C.H., Phogat S., Wrin T., Simek M.D., Koff W.C., Wilson I.A., Burton D.R., Poignard P. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies // *Nature*. – 2011. – Vol. 477. – N 7365. – P. 466-470.
 165. Wu X., Zhou T., O'Dell S., Wyatt R.T., Kwong P.D., Mascola J.R. Mechanism of human immunodeficiency virus type 1 resistance to monoclonal antibody b12 that effectively targets the site of CD4 attachment // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83. – N 21. – P. 10892-10907.
 166. Wu X., Zhou T., Zhu J., Zhang B., Georgiev I., Wang C., Chen X., Longo N.S., Louder M., McKee K., O'Dell S., Perfetto S., Schmidt S.D., Shi W., Wu L., Yang Y., Yang Z.Y., Yang Z., Zhang Z., Bonsignori M., Crump J.A., Kapiga S.H., Sam N.E., Haynes B.F., Simek M., Burton D.R., Koff W.C., Doria-Rose N.A., Connors M., Mullikin J.C., Nabel G.J., Roederer M., Shapiro L., Kwong P.D., Mascola J.R. Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing // *Science*. – 2011. – Vol. 333. – N 6049. – P. 1593-1602.
 167. Wu X.L., Yang Z.Y., Li Y.X., HogerCorp C.M., Schief W.R., Seaman M.S., Zhou T.Q., 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. – Vol. 329. – N 5993. – P. 856-861.
168. Wu Y., West A.P., Jr., Kim H.J., Thornton M.E., Ward A.B., Bjorkman P.J. Structural basis for enhanced HIV-1 neutralization by a dimeric immunoglobulin G form of the glycan-recognizing antibody 2G12 // *Cell Reports*. – 2013. – Vol. 5. – N 5. – P. 1443-1455.
 169. Xiao X., Chen W., Feng Y., Zhu Z., Prabakaran P., Wang Y., Zhang M.Y., Longo N.S., Dimitrov D.S. Germline-like predecessors of broadly neutralizing antibodies lack measurable binding to HIV-1 envelope glycoproteins: Implications for evasion of immune responses and design of vaccine immunogens // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2009. – Vol. 390. – N 3. – P. 404-409.
 170. Yang G., Holl T.M., Liu Y., Li Y., Lu X., Nicely N.I., Kepler T.B., Alam Munir S.M., Liao H.X., Cain D.W., Spicer L., VandeBerg J.L., Haynes B.F., Kelsoe G. Identification of autoantigens recognized by the 2F5 and 4E10 broadly neutralizing HIV-1 antibodies // *Journal of Experimental Medicine*. – 2013. – Vol. 210. – N 2. – P. 241-256.
 171. Yang X., Lee J., Mahony E.M., Kwong P.D., Wyatt R., Sodroski J. Highly stable trimers formed by human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins fused with the trimeric motif of T4 bacteriophage fibritin // *Journal of Virology*. – 2002. – Vol. 76. – N 9. – P. 4634-4642.
 172. Yasmeen A., Ringe R., Derking R., Cupo A., Julien J.P., Burton D.R., Ward A.B., Wilson I.A., Sanders R.W., Moore J.P., Klasse P.J. Differential binding of neutralizing and non-neutralizing antibodies to native-like soluble HIV-1 Env trimers, uncleaved Env proteins, and monomeric subunits // *Retrovirology*. – 2014. – Vol. 11. – N 1. DOI: 10.1186/1742-4690-11-41.
 173. Yi G., Qian J., Wang Z., Qi Y. A phage-displayed peptide can inhibit infection by white spot syndrome virus of shrimp // *Journal of General Virology*. – 2003. – Vol. 84. – Pt. 9. – P. 2545-2553.
 174. Yu Y., Tong P., Li Y., Lu Z.F., Chen Y.H. 10E8-like neutralizing antibodies against HIV-1 induced using a precisely designed conformational peptide as a vaccine prime // *Science China Life Sciences*. – 2014. – Vol. 57. – N 1. – P. 117-127.
 175. Zhang Z., Wu X., Longo N., Zhang B., Zhu J., NISC C., Mullikin J., Wu L., Nabel G., Connors M., Kwong P., Mascola J., Shapiro L. Deep sequencing with longitudinal sampling of a VRC01-like-antibody response in a chronically infected individual // *Retrovirology*. – 2012. – Vol. 9. – Suppl 2. – P. O36.
 176. Zhou T.Q., Xu L., Dey B., Hessel A.J., Van Ryk D., Xiang S.H., Yang X.Z., Zhang M.Y., Zwick M.B., Arthos J., Burton D.R., Dimitrov D.S., Sodroski J., Wyatt R., Nabel G.J., Kwong P.D. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120 // *Nature*. – 2007. – Vol. 445. – N 7129. – P. 732-737.
 177. Zhou T.Q., Georgiev I., Wu X.L., Yang Z.Y., Dai K.F., Finzi A., Kwon Y.D., Scheid J.F., Shi W., Xu L., Yang Y.P., Zhu J.A., Nussenzweig M.C., Sodroski J., Shapiro L., Nabel G.J., Mascola J.R., Kwong P.D. Structural Basis for Broad and Potent Neutralization of HIV-1 by Antibody VRC01 // *Science*. – 2010. – Vol. 329. – N 5993. – P. 811-817.

178. Zhu J., Wu X., Zhang B., McKee K., O'Dell S., Soto C., Zhou T., Casazza J.P., Mullikin J.C., Kwong P.D., Mascola J.R., Shapiro L. De novo identification of VRC01 class HIV-1-neutralizing antibodies by next-generation sequencing of B-cell transcripts // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2013. – Vol. 110. – N 43. – P. E4088-4097.
179. Zhu Z., Qin H.R., Chen W., Zhao Q., Shen X., Schutte R., Wang Y., Ofek G., Streaker E., Prabakaran P., Fouda G.G., Liao H.X., Owens J., Louder M., Yang Y., Klaric K.A., Moody M.A., Mascola J.R., Scott J.K., Kwong P.D., Montefiori D., Haynes B.F., Dimitrov G.D.T. Cross-reactive hiv-1-neutralizing human monoclonal antibodies identified from a patient with 2f5-like antibody // *Journal of Virology*. – 2011. – Vol. 85. – N 21. – P. 11401-11408.
180. Zolla-Pazner S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies // *Nature Reviews Immunology*. – 2004. – Vol. 4. – N 3. – P. 199-210.
181. Zolla-Pazner S. A critical question for HIV vaccine development: Which antibodies to induce? // *Science*. – 2014. – Vol. 345. – N 6193. – P. 167-168.
182. Zolla-Pazner S., Cardozo T. Structure-function relationships of HIV-1 envelope sequence-variable regions refocus vaccine design // *Nature Reviews Immunology*. – 2010. – Vol. 10. – N 7. – P. 527-535.
183. Zwick M.B., Jensen R., Church S., Wang M., Stiegler G., Kunert R., Katinger H., Burton D.R. Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies 2F5 and 4E10 require surprisingly few crucial residues in the membrane-proximal external region of glycoprotein gp41 to neutralize HIV-1 // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79. – N 2. – P. 1252-1261.
184. Zwick M.B., Labrijn A.F., Wang M., Spenlehauer C., Saphire E.O., Binley J.M., Moore J.P., Stiegler G., Katinger H., Burton D.R., Parren P.W. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41 // *Journal of Virology*. – 2001. – Vol. 75. – N 22. – P. 10892-10905.