

На правах рукописи

РЕГУЗОВА
Алёна Юрьевна

**Исследование специфической активности
полиэпитопных Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов,
полученных с использованием различных стратегий
проектирования**

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2015

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор».

***Научные
руководители:***

Карпенко Лариса Ивановна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией рекомбинантных вакцин ФБУН Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Бажан Сергей Иванович, доктор биологических наук, заведующий теоретическим отделом ФБУН Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»

***Официальные
оппоненты:***

Дейнеко Елена Викторовна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биоинженерии растений ФГБУН Института цитологии и генетики СО РАН

Шаповал Андрей Иванович, кандидат биологических наук, директор Российско-Американского противоракового центра Алтайского Государственного Университета

***Ведущая
организация:***

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России

Защита состоится «05» июня 2015 г. в 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.020.01 при ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» по адресу: р.п. Кольцово, Новосибирского района, Новосибирской области, 630559, тел. 8(383) 336-74-28. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» <http://www.vector.nsc.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

В.А. Белявская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Современная антиретровирусная терапия позволяет снижать вирусную нагрузку у ВИЧ-инфицированных больных, замедляет прогрессирование инфекции и ее переход в стадию СПИДа, но не приводит к полной элиминации вируса (Shen and Siliciano, 2008; Chomont *et al.*, 2009). В связи с этим задача создания вакцины против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) чрезвычайно актуальна. Первые положительные результаты получены в клинических испытаниях комбинированной вакцины против ВИЧ-1 RV144, в которых вакцина оказалась на 31,2 % эффективнее по сравнению с плацебо (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009). Основные выводы из этих испытаний заключались в том, что вакцину против ВИЧ создать можно, но необходимо проводить работу над повышением ее эффективности.

Рациональный дизайн вакцины должен быть направлен на формирование ВИЧ-специфических антител и CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) против широкого спектра изолятов ВИЧ-1. В связи с этим на первый план выходят альтернативные технологии дизайна иммуногенов. Одним из таких подходов является получение искусственных полиэпитопных конструкций, которые включают в свой состав только эпитопы, необходимые для стимуляции протективного иммунного ответа (McMichael and Haynes, 2012).

В данной работе будут рассматриваться вопросы, связанные с созданием только полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов. Идея создания Т-клеточных вакцин против ВИЧ-1 основана на данных, согласно которым CD8+ ЦТЛ являются эффективными медиаторами противовирусного иммунного ответа (Mudd *et al.*, 2012). В данном контексте создание искусственных полиэпитопных иммуногенов, стимулирующих антиген-специфический ответ CD8+ ЦТЛ, является перспективной стратегией для разработки вакцины против ВИЧ-1 (Kour and Douek, 2011). В настоящее время опубликовано достаточно много работ, посвященных конструированию и исследованию специфической активности искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов (Berzofsky *et al.*, 2001; Bazhan *et al.*, 2004; 2010; Belyakov *et al.*, 2004; 2006; 2007; 2012; Fischer *et al.* 2007; Karpenko *et al.*, 2007; Ahlers and Belyakov, 2010; Rosario *et al.*, 2010; Knudsen *et al.*, 2012; McMichael and Haynes, 2012). В то же время остается много нерешенных вопросов, связанных с выбором оптимальных стратегий проектирования полиэпитопных конструкций. Прогресс в определении CD4+ и CD8+ Т-клеточных эпитопов ВИЧ-1 и понимание особенностей процессинга эндогенно синтезирующихся антигенов по пути главного комплекса гистосовместимости (МНС) I и МНС II классов дает

основу для дизайна полиэпитопных вакцин, индуцирующих ВИЧ-специфический Т-клеточный ответ.

Для создания эффективной Т-клеточной вакцины против ВИЧ необходимо применять не только рациональные подходы к конструированию, но и современные информативные методы для оценки Т-клеточного ответа. Появление технологии пептид-МНС-мультимеров предоставляет исследователям возможность визуализировать ВИЧ-специфические Т-лимфоциты, определять их количество в образце и проводить их последующий анализ на уровне одной клетки. Использование пептид-МНС-мультимеров в комбинации с другими методами фенотипической и функциональной оценки Т-клеток позволяет детально охарактеризовать клеточный ответ в результате вакцинации и в дальнейшем определить параметры протективной иммунной защиты от ВИЧ.

Цель и задачи исследования

Цель работы: провести исследование специфической активности полиэпитопных вакцинных конструкций против ВИЧ-1, спроектированных с учетом особенностей процессинга и презентации Т-клеточных антигенов, а также изучение формирования ВИЧ-специфических CD8⁺ Т-лимфоцитов с помощью метода пептид-МНС-пентамеров у добровольцев, вакцинированных «КомбиВИЧвак».

Задачи исследования:

1. Получить ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие полиэпитопные Т-клеточные ВИЧ-1 иммуногены, разработанные с использованием различных стратегий проектирования, и подтвердить экспрессию продуктов целевых генов *in vitro*.
2. Исследовать способность полученных ДНК-вакцинных конструкций стимулировать ВИЧ-специфические ответы CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у мышей линии BALB/c.
3. Провести сравнительное исследование иммуногенности ДНК-вакцинных конструкций и определить, какой из полиэпитопных иммуногенов индуцирует наиболее высокие уровни ВИЧ-специфических ответов CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов.
4. Изучить формирование Env- и Gag-специфических CD8⁺ Т-лимфоцитов с использованием пептид-МНС-пентамеров у вакцинированных добровольцев в рамках I фазы клинических испытаний вакцины «КомбиВИЧвак».

Научная новизна работы

В данной работе впервые в рамках одного исследования получены ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие полиэпитопные ВИЧ-1 иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3, спроектированные с учетом особенностей процессинга и презентации Т-клеточных антигенов по пути МНС I и МНС II классов, а также проведено сравнительное исследование их специфической активности.

Подтверждено, что добавление сигнальных последовательностей, а именно N-концевого убиквитина (в составе TCI-N3) или N-концевой сигнальной последовательности белка E3/gp19K аденовирусов и C-концевого тирозинового мотива LAMP-1 (в составе TCI-N2) к последовательности Т-клеточного иммуногена (TCI-N) повышает уровень антиген-специфического CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточного иммунного ответа. В данном исследовании впервые было показано, что полиэпитопная конструкция TCI-N3, содержащая N-концевой убиквитин, является наиболее эффективной, так как индуцирует наиболее высокий уровень CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-2 и IFN γ .

Впервые использована методика пептид-МНС-пентамеров для определения количества антиген-специфических Т-лимфоцитов в рамках I фазы клинических испытаний вакцины против ВИЧ. Показано, что после иммунизации вакциной «КомбиВИЧвак» у добровольцев формируются ВИЧ-1 Env- и Gag-специфические CD8⁺ Т-лимфоциты. Это говорит в пользу рациональности использования полиэпитопных иммуногенов в составе вакцин для индукции вирус-специфического клеточного иммунного ответа.

Теоретическая и практическая значимость работы

На основе новейших литературных данных предложены различные стратегии дизайна полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов – прототипов для использования в качестве ДНК-вакцин против ВИЧ-1. Выявлены возможные способы повышения иммуногенности полиэпитопных конструкций путем оптимизации структуры ВИЧ-1 иммуногенов, а также с помощью дополнительных N- и C-концевых сигнальных последовательностей, увеличивающих уровень процессинга и презентации выбранных эпитопов CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитам. Полученные данные позволят усовершенствовать методы дизайна искусственных полиэпитопных иммуногенов для индукции ВИЧ-специфического Т-клеточного ответа, а также могут быть использованы в качестве стратегий повышения иммуногенности ДНК-вакцин против ряда патогенов человека и животных.

Положения, выносимые на защиту

1. ДНК-вакцинные конструкции, разработанные с использованием различных стратегий проектирования Т-клеточных иммуногенов, обеспечивают экспрессию генов, кодирующих полиэпитопные белки TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3, и способны индуцировать ВИЧ-специфические ответы IFN γ - и IL-2-продуцирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у иммунизированных мышей линии BALB/c.
2. Использование N- и C-концевых сигнальных последовательностей – N-концевого убиквитина или N-концевой сигнальной последовательности белка E3/gp19K аденовирусов и C-концевого тирозинового мотива LAMP-1, способствующих процессингу и презентации эпитопов по пути МНС I и МНС II класса, – приводит к повышению иммуногенности спроектированных ДНК-вакцинных конструкций.
3. Убиквитин-зависимое нацеливание полиэпитопной конструкции на протеасому является более перспективной стратегией повышения ее иммуногенности по сравнению с нацеливанием на лизосому с помощью N-концевой сигнальной последовательности белка E3/gp19K аденовирусов в сочетании с тирозиновым мотивом LAMP-1.
4. Вакцина «КомбиВИЧвак» индуцирует формирование Env- и Gag-специфических CD8⁺ Т-лимфоцитов у добровольцев на I фазе клинических испытаний.

Апробация и публикации

По результатам работы опубликованы 4 статьи в журналах из списка ВАК, рекомендованных для защиты диссертаций. Также материалы работы были представлены на всероссийских и международных конференциях, по итогам которых опубликовано 12 тезисов.

Вклад автора

Все основные эксперименты, включая наработку препаративного количества рекомбинантных плазмид, кодирующих полиэпитопные иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3, их очистку и дальнейшее изучение экспрессии целевых генов *in vitro*, а также иммунизацию лабораторных животных сконструированными ДНК-вакцинными конструкциями и анализ клеточных образцов на проточном цитофлуориметре для исследования способности CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов продуцировать IL-2 и IFN γ , выполнены автором лично. Дизайн аминокислотной последовательности полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов был выполнен в теоретическом отделе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» канд. биол. наук Антонцом Д.В.

Конструирование рекомбинантных плазмид, кодирующих полиэпитопные иммуногены, было проведено совместно с канд. биол. наук Максютковым Р.А. Исследование формирования ВИЧ-1 Env- и Gag-специфических CD8+ Т-лимфоцитов с помощью пептид-МНС-пентамеров у HLA A*0201-позитивных добровольцев в рамках I фазы клинических испытаний вакцины «КомбиВИЧвак», в том числе разработка протокола, проводилась автором лично. Статистический анализ данных выполнен совместно с канд. биол. наук Антонцом Д.В. в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов работы и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 150 страницах текста, содержит 20 рисунков и 8 таблиц. Список литературы состоит из 310 ссылок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для выполнения представленной работы был применен широкий спектр методов: работа с нуклеиновыми кислотами (клонирование ДНК, конструирование рекомбинантных плазмид, их наработка в системе *E. coli* и очистка рекомбинантных плазмид); оценка экспрессии генов *in vitro* с использованием эукариотических клеток (трансформация и культивирование), анализ белков (вестерн-блот, внутриклеточная детекция белков с использованием флуоресцентно-меченых моноклональных антител), работа с лабораторными животными (иммунизация, выделение спленоцитов), изучение клеточного иммунного ответа (культивирование и стимуляция спленоцитов, иммунофлуоресцентное окрашивание клеток, внутриклеточное окрашивание цитокинов, проточная цитометрия), работа с периферическими мононуклеарными клетками крови человека (иммунофлуоресцентное окрашивание клеток, окрашивание пептид-МНС-пентамерами).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проектирование искусственных полиэпитопных Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3. Дизайн нескольких вариантов новых полиэпитопных ВИЧ-1 иммуногенов – TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 – был проведен с учетом оптимизации экспрессии, процессинга и представления иммунной системе CD4+ и CD8+ Т-клеточных эпитопов. Предсказание Т-клеточных эпитопов и дизайн аминокислотной последовательности иммуногенов осуществляли с

использованием программного обеспечения TEpredict и PolyCTLDesigner (Antonets and Bazhan, 2013; <http://tepredict.sourceforge.net/PolyCTLDesigner.html>). При этом были выбраны консервативные Т-клеточные эпитопы в последовательностях белков ВИЧ-1 Env, Gag, Pol, Nef и Tat. Выбор проводился из списка экспериментально верифицированных CD8+ и CD4+ Т-клеточных эпитопов, представленных в HIV molecular immunology database (http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/optimal_ctl_summary.html). Общая стратегия проектирования целевых иммуногенов представлена на рисунке 1.

С целью повышения иммуногенности полиэпитопных конструкций в их структуру были включены дополнительные последовательности:

- N-концевой убиквитин (Ub):
MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLS
DYNIQKESTLHLVLRRLRGV₇₆;
- N-концевой сигнальный пептид – ER-signal (в нашем случае MRYMILGLLALAAVCSAA – сигнальная последовательность белка E3/gp19K аденовирусов);
- С-концевой тирозиновый мотив LAMP-1 (RKRSHAGYQTI).

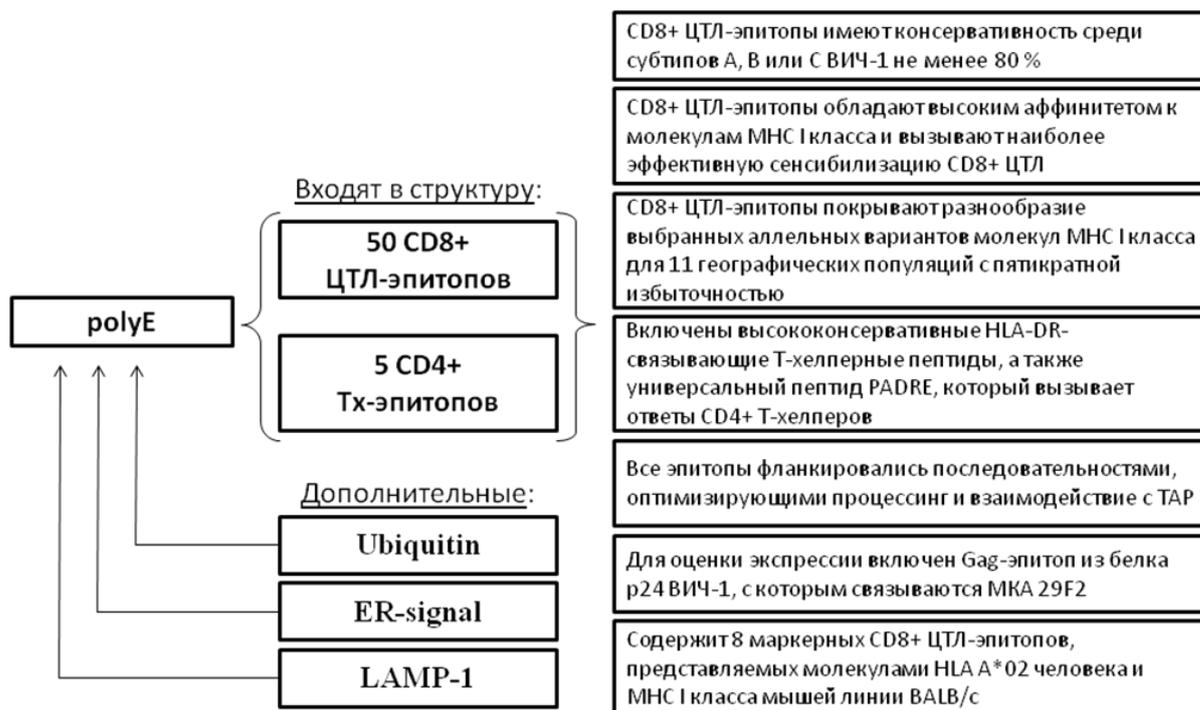


Рисунок 1. Общая стратегия проектирования целевых Т-клеточных иммуногенов

Согласно предложенному дизайну N- и С-концевые последовательности использовались в трех различных комбинациях. В результате были спроектированы целевые последовательности трех Т-клеточных иммуногенов – TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3, обеспечивающих презентацию целевых эпитопов в

составе белка polyE CD8+ и CD4+ Т-лимфоцитам по пути МНС I и МНС II классов (рис. 2).

Первая конструкция TCI-N (или polyE) не содержит концевых сигнальных последовательностей и кодирует только «коровую» последовательность polyE.

Вторая конструкция TCI-N2 (или ER-signal_polyE_LAMP-1) была спроектирована таким образом, чтобы обеспечить нацеливание polyE иммуногена в лизосому для его процессинга и презентации по пути МНС II класса (Wu *et al.*, 1995; de Arruda *et al.*, 2004). В данном случае для фланкирования полиэпитопной конструкции TCI-N2 использовали две последовательности – N-концевой сигнальный пептид (ER-signal) и C-концевой тирозиновый мотив LAMP-1. LAMP-мотив направляет этот иммуноген из секреторного пути на деградацию в лизосомы, где образующиеся пептидные фрагменты связываются с молекулами МНС II класса и затем представляются на поверхности антиген-презентирующей клетки (АПК) CD4+ Т-лимфоцитам.

Третья конструкция TCI-N3 (Ub_polyE), содержащая N-концевой убиквитин, нацеливает полиэпитопный иммуноген polyE в протеасому для его процессинга по убиквитин-зависимому пути для усиления ответов CD8+ ЦТЛ.

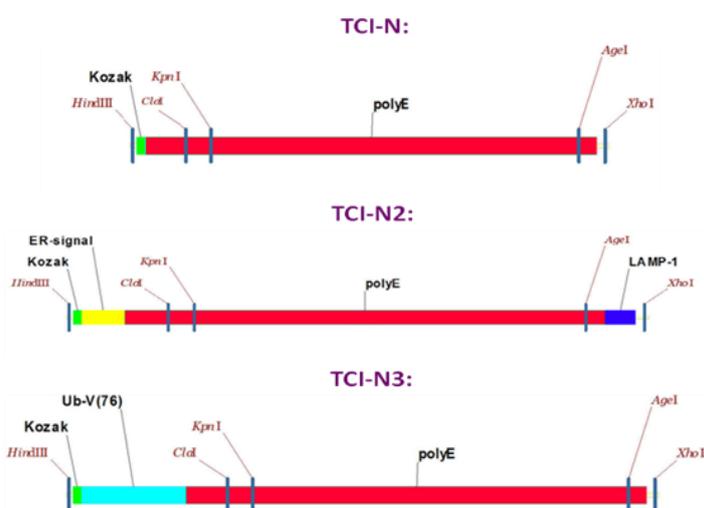


Рисунок 2. Структуры спроектированных полиэпитопных иммуногенов TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 на основе «коровой» последовательности polyE

Конструирование рекомбинантных плазмид, кодирующих полиэпитопные Т-клеточные иммуногены. Для дизайна последовательностей синтетических генов TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 использовалась программа «GeneDesigner», позволяющая оптимизировать последовательности генов для их высокой экспрессии в клетках человека. На 5'-конце перед иницирующим кодоном ATG добавлена последовательность Kozak (CCGCCACC). В конце кодирующих последовательностей размещены три стоп-кодона (TAGTGATGA). Синтез генов, кодирующих полиэпитопные иммуногены TCI-N (polyE),

TCI-N2 (ER-signal_polyE_LAMP-1) и TCI-N3 (Ub_polyE), осуществлен химико-ферментативным способом в ЗАО «Евроген». Далее целевые гены были клонированы в составе плазмидного вектора pcDNA3.1/Myс-His(+)/lacZ (Invitrogen, США) (далее pcDNA3.1) по сайтам рестрикции *Hind*III и *Xho*I. В результате были получены три целевые рекомбинантные плазмиды:

p1:pcDNA_Kozak_polyE(TCI-N);

p2:pcDNA_Kozak_ER-signal_polyE_LAMP-1(TCI-N2);

p3: pcDNA_Kozak_Ub_polyE(TCI-N3).

Правильность полученных трех целевых генных конструкций p1, p2 и p3 в составе плазмиды pcDNA3.1 подтверждена секвенированием по обеим цепям.

Клетки *E. coli* BL21 были трансформированы плазмидами p1, p2 и p3, кодирующими полиэпитопные белки TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3. Этот штамм *E. coli* обеспечивал наибольший выход плазмидной ДНК. Были наработаны препаративные количества рекомбинантных плазмидных ДНК, используемых в дальнейшем для трансфекции эукариотических клеток и иммунизации лабораторных животных.

Изучение экспрессии целевых генов в клетках 293Т, трансфицированных рекомбинантными плазмидами. Для оценки экспрессии целевых генов *in vitro* проводили трансфекцию клеток 293Т рекомбинантными плазмидами p1, p2 и p3. Через 48 ч после трансфекции исследовали продукцию полиэпитопных белков. В вестерн-блот анализе с использованием МКА 29F2 к Gag-эпитопу-маркеру, включенному в состав всех исследуемых белков, были обнаружены специфичные белковые фрагменты преимущественно в области 14 кДа (рис. 3А). Полученные данные являются закономерными, поскольку полиэпитопные белки TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 содержат сайты протеолитического расщепления с использованием ферментативных систем клетки, что обеспечивает их процессинг, поэтому полноразмерные целевые белки являются нестабильными в клетке.

Подверженность полиэпитопных белков протеолитической деградации была подтверждена в прокариотической системе экспрессии *E. coli*. Для этого мы анализировали в иммуноблоттинге с использованием МКА 29F2 клеточные лизаты *E. coli* после трансформации плазмидой pGEX-4T-TCI-N (плазида получена от Баранова К.О., ИМКБ СО РАН), которая экспрессирует ген целевого белка TCI-N polyE под прокариотическим промотором. При этом были выявлены дискретные специфические белковые фрагменты различной молекулярной массы (рис. 3Б).

Для доказательства экспрессии целевых генов был также применен высокочувствительный метод внутриклеточной детекции полиэпитопных белков

на основе проточной цитометрии. Для этого клетки 293Т, трансфицированные плазмидами р1, р2 и р3, фиксировали с последующей пермеабиллизацией мембраны с использованием набора Cytofix/Сytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD, США). Это позволяло FITC-меченым МКА 29F2 проникать внутрь клетки и специфически связываться с содержащимся в составе целевых иммуногенов TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 Gag-эпитопом.

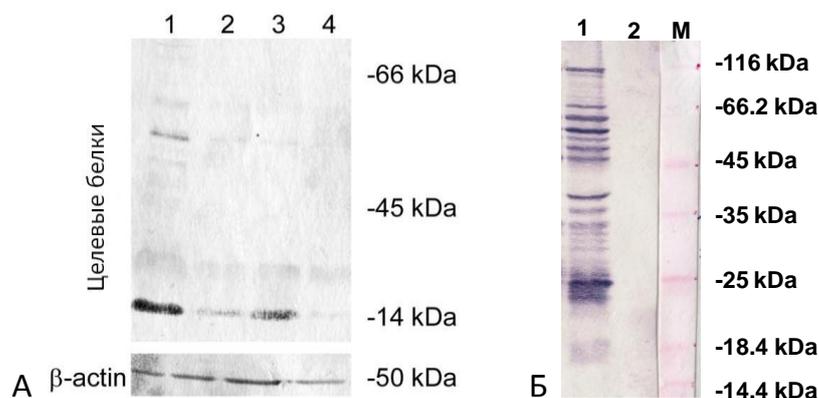


Рисунок 3. Вестерн-блот анализ продуктов экспрессии генов, кодирующих полиэпитопные белки TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3. А) Дорожки 1, 2, 3 содержат лизаты клеток 293Т, трансфицированных плазмидами р1, р2 и р3; 4 – отрицательный контрольный образец, представляющий лизат клеток 293Т, трансфицированных исходным вектором рсDNA3.1.; стрелками указан молекулярный вес белков; снизу представлен контроль количества клеток с использованием антител к β -актину. Б) Дорожка 1 содержит лизат клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой рGEX-4Т-TCI-N; Дорожка 2 содержит лизат клеток *E. coli* без трансформации; М – маркер молекулярной массы белков

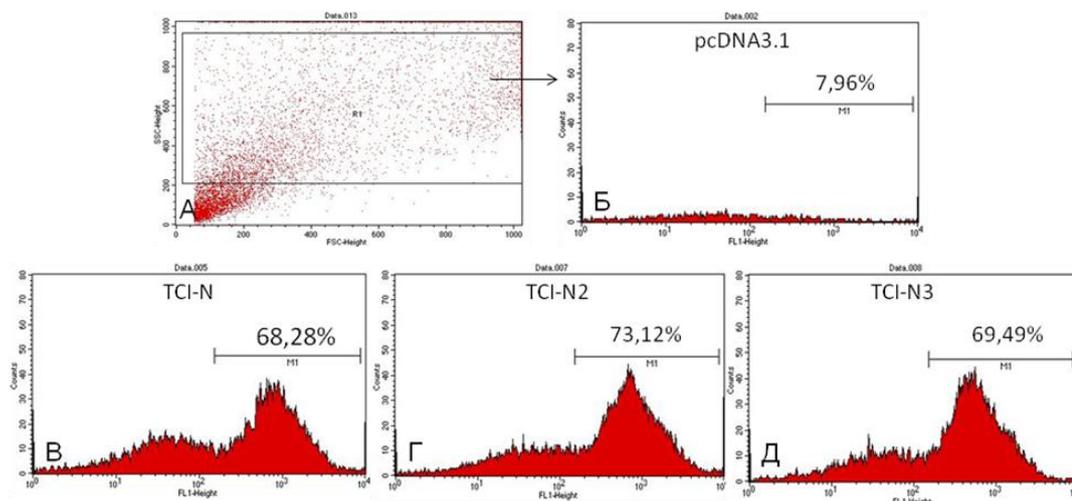


Рисунок 4. Внутриклеточная детекция полиэпитопных белков TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 с помощью МКА 29F2, меченых FITC. А) Гейтирование клеток 293Т; Б), В), Г), Д) Гистограммы, отражающие степень интенсивности свечения по FL1 окрашенных антителами 29F2-FITC клеток 293Т, трансфицированных плазмидами рсDNA3.1, р1, р2 и р3 и содержащих Gag-эпитоп-маркер. М1 – область специфической флуоресценции, демонстрирующая наличие Gag-эпитопа-маркера в эукариотических клетках, с которым специфически связываются антитела

При анализе клеточных образцов на проточном цитометре BD FACSCalibur был зарегистрирован пик специфической флуоресценции в области положительных значений по сравнению с отрицательным контрольным образцом (рис. 4).

Иммунизация лабораторных животных сконструированными ДНК-вакцинными конструкциями и сбор образцов. Иммуногенность полученных ДНК-вакцинных конструкций была исследована на модели лабораторных мышей инбредной линии BALB/c. Группы мышей (N = 30) иммунизировали рекомбинантными плазмидами p1, p2 и p3 на 0-й, 28-й и 56-й дни. В качестве отрицательного контроля для иммунизации мышей (N = 7) использовали векторную плазмиду pcDNA3.1. В качестве положительного контроля для иммунизации мышей (N = 30) использовали плазмиду pcDNA-TCI – компонент вакцины «КомбиВИЧвак» (Bazhan *et al.*, 2004, 2008; Karpenko *et al.*, 2004, 2007). Для исследования клеточного иммунного ответа проводили забой части иммунизированных животных (N = 10) в каждой группе: на 14-й, 35-й и 72-й эксперимента с целью получения клеточных образцов.

Изучение способности искусственных полиэпитопных иммуногенов TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 стимулировать ВИЧ-специфические ответы CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов. В качестве ключевых параметров для сравнительного исследования иммуногенности полиэпитопных конструкций было установление способности CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов продуцировать IL-2 и IFN γ . IL-2 и IFN γ – ключевые цитокины, которые, как предполагается, связаны с контролем ВИЧ-инфекции (Akinsiku *et al.*, 2011; Reuter *et al.*, 2012). Определение количества CD4+ и CD8+ Т-клеток, продуцирующих IL-2 и IFN γ , была изучена с помощью метода внутриклеточного окрашивания цитокинов после *in vitro* стимуляции спленоцитов, выделенных у иммунизированных животных, смесью синтетических пептидов, соответствующих эпитопам ВИЧ-1: AMQMLKETI (p24), IFQSSMTKI (RT), FEPFRDYVDR (p24), VYYDPSKDLI (RT), SYHRLRDFI (gp160), SLYNTVATL (p17). Последовательности пептидов являются точными копиями последовательностей эпитопов, входящих в состав целевых иммуногенов. Анализ клеточных образцов осуществляли на проточном цитометре BD FACSCalibur. Результаты статистической обработки этих данных приведены на рис. 5 – 8.

После каждой иммунизации рекомбинантными плазмидами p1, p2 и p3 в группах мышей уровни IL-2- и IFN γ -продуцирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов были достоверно выше, чем в отрицательной контрольной группе животных, которым вводили векторную плазмиду pcDNA3.1 ($P \leq 0,05$) (рис. 5 – 8).

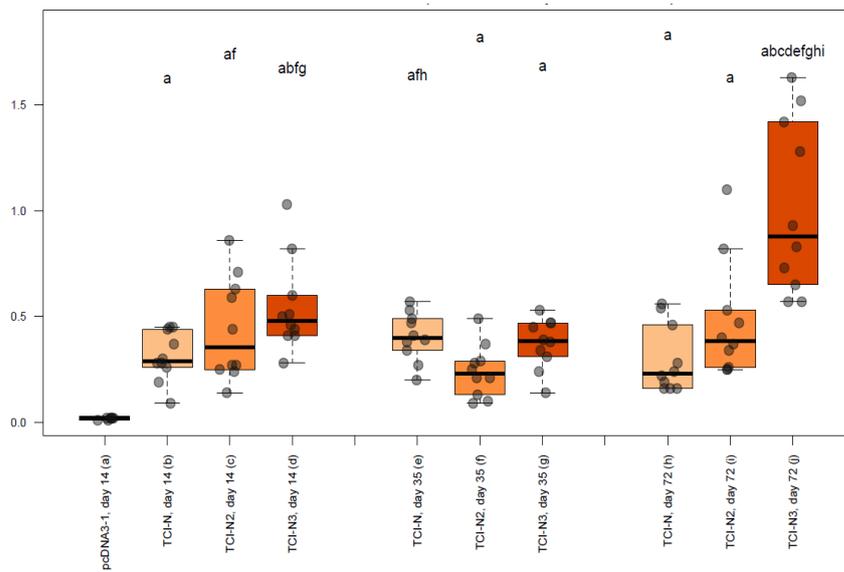


Рисунок 5. Продукция IL-2 CD4+ Т-лимфоцитами на 14-й, 35-й и 72-й день эксперимента ($P \leq 0.05$). % IL-2-продуцирующих CD4+ Т-лимфоцитов (от общего числа CD4+ Т-клеток) показан на оси Y. Различные сроки забора клеточных образцов у иммунизированных животных отображены на оси X

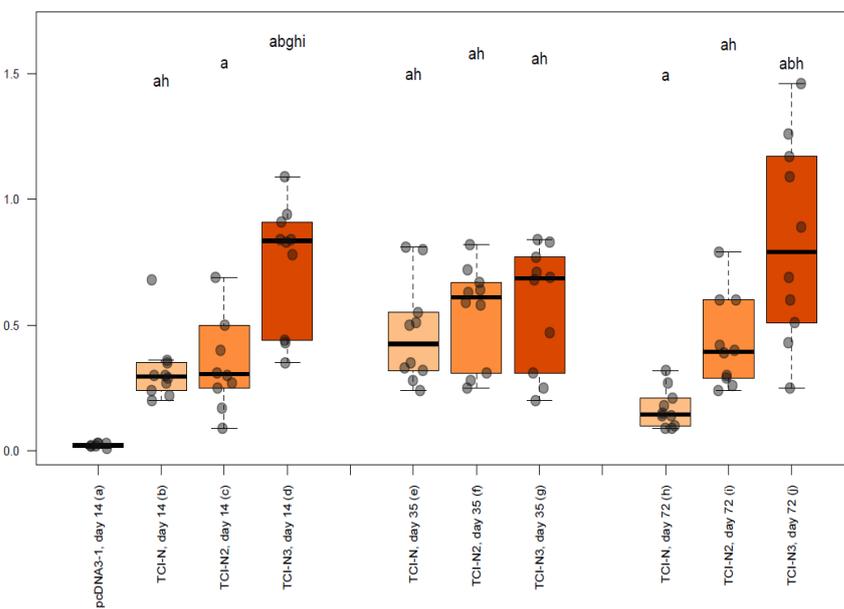


Рисунок 6. Продукция IFN γ CD4+ Т-лимфоцитами на 14-й, 35-й и 72-й день эксперимента ($P \leq 0.05$). % IFN γ -продуцирующих CD4+ Т-лимфоцитов (от общего числа CD4+ Т-клеток) показан на оси Y. Различные сроки забора клеточных образцов у иммунизированных животных отображены на оси X

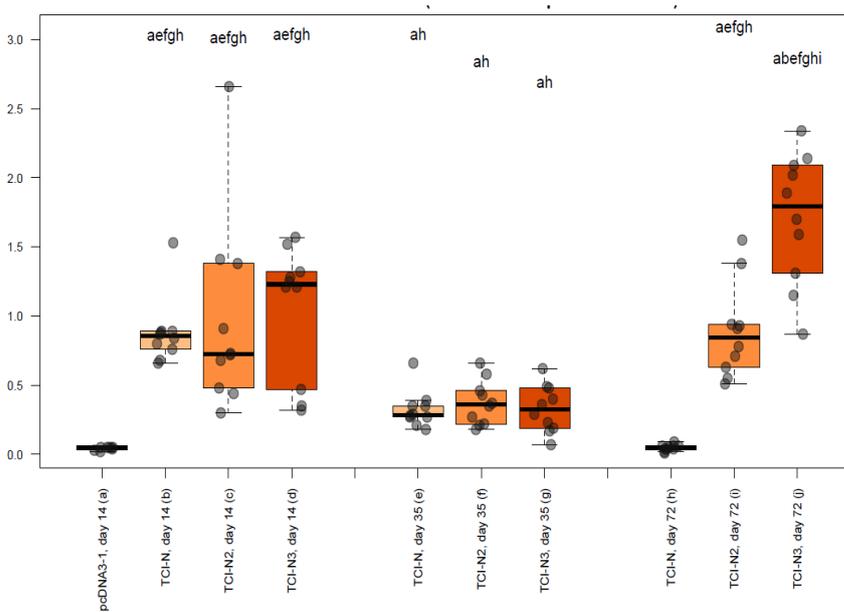


Рисунок 7. Продукция IL-2 CD8+ Т-лимфоцитами на 14-й, 35-й и 72-й день эксперимента ($P \leq 0.05$). % IL-2-продуцирующих CD8+ Т-лимфоцитов (от общего числа CD8+ Т-клеток) показан на оси Y. Различные сроки забора клеточных образцов у иммунизированных животных отображены на оси X

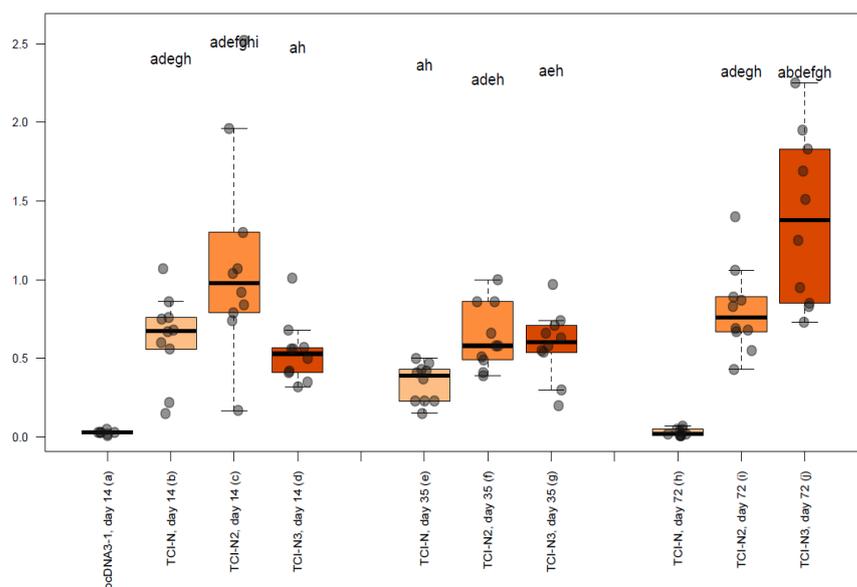


Рисунок 8. Продукция $IFN\gamma$ $CD8^+$ Т-лимфоцитами на 14-й, 35-й и 72-й день эксперимента ($P \leq 0.05$). % $IFN\gamma$ -продуцирующих $CD8^+$ Т-лимфоцитов (от общего числа $CD8^+$ Т-клеток) показан на оси Y. Различные сроки забора клеточных образцов у иммунизированных животных отображены на оси X

Данный факт свидетельствует о том, что спроектированные полиэпитопные Т-клеточные иммуногены проходят правильный процессинг в АПК клетках, обеспечивают презентацию освободившихся эпитопов $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитам и вызывают формирование ВИЧ-специфического Т-клеточного ответа у иммунизированных животных.

Исследование влияния дополнительных сигнальных последовательностей на иммуногенность полиэпитопных конструкций. После трехкратного введения ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие иммуногены TCI-N2 и TCI-N3 (содержащие ER-signal + LAMP-1 и убиквитин соответственно), обеспечивают статистически достоверное увеличение ВИЧ-специфического $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеточного ответа по сравнению с конструкцией, кодирующей иммуноген TCI-N без дополнительных сигнальных последовательностей ($P \leq 0,05$) (рис. 5 – 8). Полученные результаты косвенно подтверждают теоретические предположения о том, что повышение эффективности процессинга Т-клеточных эпитопов за счет нацеливания полиэпитопных белков на деградацию в протеасоме (за счет присоединения убиквитина) или лизосоме (за счет присоединения ER-сигнального пептида и мотива LAMP-1) ведет к увеличению количества комплексов МНС-пептид на поверхности АПК и способствует усилению иммуногенности конструкции (Grant *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2000). Таким образом, в нашем исследовании было показано, что N-концевой убиквитин, N-концевая сигнальная последовательность белка E3/gp19K аденовирусов (ER-signal) и С-концевой тирозиновый мотив LAMP-1 способствуют повышению иммуногенности полиэпитопных ДНК-вакцин.

Выбор наиболее эффективной ДНК-вакциной конструкции, стимулирующей наибольший уровень ВИЧ-специфического CD4+ и CD8+ Т-клеточного ответа. Согласно данным, представленным на рисунках 5 – 8, плазида р3, кодирующая иммуноген TCI-N3 (Ub_polyE), достоверно индуцирует наибольший уровень IL-2- и IFN γ -продуцирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов по сравнению с иммуногенами TCI-N (polyE) и TCI-N2 (ER-signal_polyE_LAMP-1) после трехкратной иммунизации ($P \leq 0,05$). Полученные результаты позволяют сделать вывод, что убиквитин-зависимое нацеливание полиэпитопного белка на протеасому является предпочтительным, так как оно обеспечивает более выраженный ответ как CD8+, так и CD4+ Т-лимфоцитов. Усиление CD8+ Т-клеточного ответа, вероятнее всего, происходит за счет повышения презентации эндогенно синтезируемого антигена по пути МНС I класса в результате убиквитин-зависимой протеасомной деградации (Bauer *et al.*, 2006), а более эффективная стимуляция CD4+ Т-клеточного ответа, вероятно, – за счет механизма, который обеспечивает переключение презентации антигена с МНС-I на МНС-II путь. Этот механизм был описан в литературе как «утечка», в результате чего часть антигена может высвободиться в составе аутофагосомы и транспортироваться из цитоплазмы в лизосому по пути МНС II класса (Leitner and Restifo, 2003; Schmid *et al.*, 2007). В результате происходит индукция CD4+ Т-лимфоцитов, которые, как известно, усиливают ответы CD8+ ЦТЛ.

Способны ли предложенные стратегии оптимизации структуры искусственных иммуногенов усилить Т-клеточные ответы по сравнению с неоптимизированными антигенами? Для сравнения в качестве неоптимизированного антигена был выбран иммуноген TCI, кодируемый в составе рекомбинантной плазмиды рсDNA-TCI, являющейся компонентом вакцины «КомбиВИЧвак» (Vazhan *et al.*, 2004, 2008; Karpenko *et al.*, 2004, 2007). Согласно полученным результатам (рис. 9), среди трех оптимизированных конструкций – TCI-N, TCI-N2, TCI-N3 – только одна, а именно TCI-N3 (Ub_polyE), оказалась более иммуногенной в отношении индукции ВИЧ-специфических IL-2- и IFN γ -продуцирующих CD4+ Т-лимфоцитов, а также IL-2-продуцирующих CD8+ Т-лимфоцитов по сравнению с неоптимизированным иммуногеном TCI ($P \leq 0,05$). Хотя положительный эффект был достигнут только после третьей иммунизации, полученные результаты позволяют говорить о том, что путем оптимизации структуры иммуногена можно получить вакцину, которая по иммуногенности будет превосходить вакцины, полученные на основе нативных антигенов.

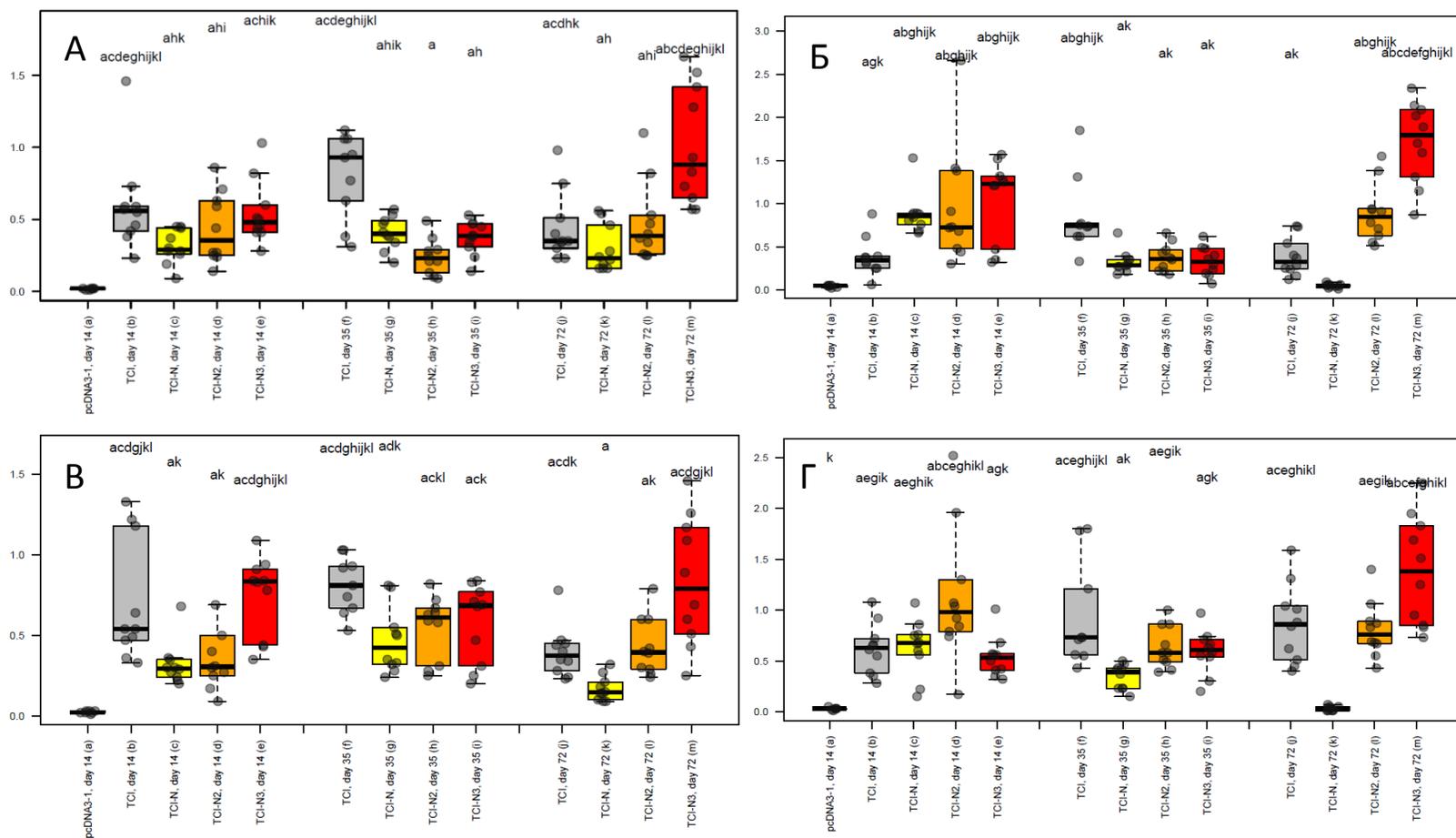


Рисунок 9. Количество IL-2- и IFN γ -продуцирующих Т-лимфоцитов в каждой группе опытных животных после каждой иммунизации ($P \leq 0.05$). А) – количество IL-2-продуцирующих CD4+ Т-лимфоцитов; Б) – количество IL-2-продуцирующих CD8+ Т-лимфоцитов; В) – количество IFN γ -продуцирующих CD4+ Т-лимфоцитов; Г) – количество IFN γ -продуцирующих CD8+ Т-лимфоцитов. Уровни цитокин-продуцирующих Т-лимфоцитов (в % от общего количества CD4+ или CD8+ Т-лимфоцитов) показаны на оси Y. Различные сроки заора клеточных образцов у иммунизированных животных отображены на оси X

Исследование формирования ВИЧ-специфических CD8+ Т-лимфоцитов у добровольцев, иммунизированных вакциной «КомбиВИЧвак». Иммуногенность вакцины «КомбиВИЧвак», в том числе ДНК-компонента рсDNA-TCl, была продемонстрирована на этапе доклинических испытаний на модели мышей (Vazhan *et al.*, 2004, 2008; Karpenko *et al.*, 2004, 2007). Однако использование мышинной модели не является оптимальной из-за различий в степени связывания Т-клеточного рецептора с комплексом МНС-пептид на поверхности АПК. В данном исследовании стояла цель оценить презентацию выбранных эпитопов, входящих в структуру Т-клеточного иммуногена TCl, в составе человеческих молекул HLA, чтобы подтвердить, что выбранные эпитопы проходят правильный процессинг и представление Т-лимфоцитам *in vivo*, в результате чего формируются ВИЧ-специфические CD8+ ЦТЛ. Это было реализовано в рамках I фазы клинических испытаний «КомбиВИЧвак» с использованием МНС-пентамеров в комплексе с пептидами ВИЧ-1 Env- и Gag- и проточной цитометрии.

Описание вакцины и клинических испытаний. Комбинированная вакцина «КомбиВИЧвак» объединяет два полиэпитопных иммуногена: полиэпитопный белок ТВ1 стимулирует образование ВИЧ-специфического гуморального ответа; полиэпитопный белок TCl, кодируемый ДНК-вакциной (плазмида рсDNA-TCl), направлен на формирование ВИЧ-специфических CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов (Karpenko *et al.*, 2004; 2007). Вакцина «КомбиВИЧвак» прошла доклинические испытания, экспертизу в ФГБУ «ГИСК им. Тарасевича Л.А.» Минздравсоцразвития России и получила разрешение Росздравнадзора на проведение первой фазы клинических исследований (Регистрационный номер – RegNx 123539 RegWorkNx: 61708 ФГУ НЦЭСМП Росздравнадзора). Данное исследование было одобрено Комитетом по этике Минздрава РФ. Все добровольцы подписали информированное согласие для их участия в испытании. Тест с использованием пептид-МНС-пентамеров был включен в список разрешенных Росздравнадзором исследований в рамках I фазы клинических испытаний «КомбиВИЧвак». Добровольцы методом случайного выбора были распределены на 2 группы: опытная группа 1 (15 добровольцев) была привита вакциной «КомбиВИЧвак» однократно, опытная группа 2 (15 добровольцев) привита вакциной «КомбиВИЧвак» двукратно с интервалом 28 дней.

Методика пептид-МНС-пентамеров была впервые использована в рамках исследования Т-клеточного ответа в клинических испытаниях вакцин, проводимых в России, она потребовала особого внимания и отработки

протокола в условиях эксперимента. На этом основании данный раздел явился отдельной исследовательской работой.

Определение Env- и Gag-специфических CD8+ Т-лимфоцитов у HLA A*0201-позитивных добровольцев, вакцинированных «КомбиВИЧвак». Для выполнения этой задачи были использованы коммерчески доступные Pro5 МНС-пентамеры I класса в комплексе с пептидами ВИЧ-1 Env D1 (KLTPLCVTL aa 120-128) и Gag 17A (SLYNTVATL aa 77-85) в сочетании с флуоресцентно мечеными анти-CD8 МКА (ProImmune, Великобритания). Пептид-МНС-пентамеры характеризуются HLA-специфичностью, в связи с этим мы использовали МНС-пентамеры, специфичные к наиболее распространенному в человеческой популяции HLA аллелю I класса – HLA A*0201. В результате предварительного HLA-генотипирования в группе добровольцев, вакцинированных однократно, генотипом HLA A*02 обладали шесть человек, в группе добровольцев, вакцинированных двукратно, – шесть человек. На протяжении исследования в крови иммунизированных «КомбиВИЧвак» добровольцев были обнаружены CD8+ Т-лимфоциты, специфичные к Env- и Gag-эпитопам ВИЧ-1 (табл. 1, 2). Фоновый уровень пентамер-специфических CD8+ Т-клеток у исследуемых участников испытаний составил $\leq 0,1\%$ от общего количества CD8+ Т-лимфоцитов перед началом вакцинации.

Наибольшее количество Env-специфических CD8+ Т-клеток было зарегистрировано у всех исследуемых добровольцев (100 %) на 14-й день после введения вакцины как в группе с однократной вакцинацией (1,05 % от числа CD8+ Т-клеток), так и с двукратной (1,7 % от числа CD8+ Т-клеток) и было достоверно выше фонового уровня до вакцинации ($P \leq 0,01$), после чего постепенно снижалось (табл. 1, 2; рис. 10, 11). Повторная вакцинация «КомбиВИЧвак» стимулировала достоверное повышение медианного значения KLTPLCVTL+ CD8+ Т-клеток через полгода после начала эксперимента по сравнению с их количеством в группе однократно вакцинированных ($P \leq 0,01$) (табл. 1, 2; рис. 10, 11). После 6 месяцев количество Env-специфических CD8+ Т-лимфоцитов падает до фонового уровня (0,1 %), однако практически у всех исследуемых добровольцев из обеих групп детектируются единичные KLTPLCVTL+ CD8+ Т-клетки (табл. 1, 2), которые, вероятно, являются Т-клетками памяти, а большая часть невостребованных CD8+ KLTPLCVTL+ Т-лимфоцитов, возможно, подвергается апоптозу.

Таблица 1

Результаты определения ВИЧ-специфических CD8+ Т-лимфоцитов у добровольцев, вакцинированных «КомбиВИЧвак» с использованием двух МНС-пентамерных комплексов после однократной вакцинации. В таблице приведено количество SLYNTVATL+ CD8+ и KLTPLCVTL+ CD8+ Т-лимфоцитов и процент (в скобках) от общего числа CD8+ Т-лимфоцитов в пробе

Код добровольца	14 день		28 день		3 месяца		6 месяцев		9 месяцев		12 месяцев	
	SLY	KLT	SLY	KLT	SLY	KLT	SLY	KLT	SLY	KLT	SLY	KLT
1/2	2 (0)	67 (1,1)	2 (0)	105 (0,5)	н. д.	н. д.	2 (0)	57 (0,2)	65 (0,5)	12 (0,1)	0 (0)	18 (0,1)
1/3	2 (0)	128 (0,9)	7 (0)	118 (0,6)	0 (0)	4 (0,2)	1 (0)	15 (0,2)	14 (0,2)	13 (0,2)	0 (0)	5 (0,1)
1/7	3 (0)	273 (1,3)	2 (0)	76 (0,3)	0 (0)	8 (0,2)	2 (0)	22 (0,2)	6 (0,1)	8 (0,1)	0 (0)	4 (0,1)
1/9	0 (0)	23 (0,6)	2 (0)	113 (0,7)	0 (0)	25 (0,3)	3 (0)	21 (0,2)	1 (0,1)	9 (0,3)	0 (0)	7 (0,1)
1/12	0 (0)	157 (0,9)	0 (0)	102 (0,5)	0 (0)	37 (0,2)	76 (0,2)	6 (0)	4 (0)	6 (0,1)	н. д.	н. д.
1/14	0 (0)	58 (1,5)	0 (0)	61 (1,0)	н. д.	н. д.	3 (0)	33 (0,1)	2 (0,1)	33 (0,7)	0 (0)	6 (0,1)
Медианное значение	0	1,05	0	0,6	0	0,2	0	0,2	0,1	0,15	0	0,1

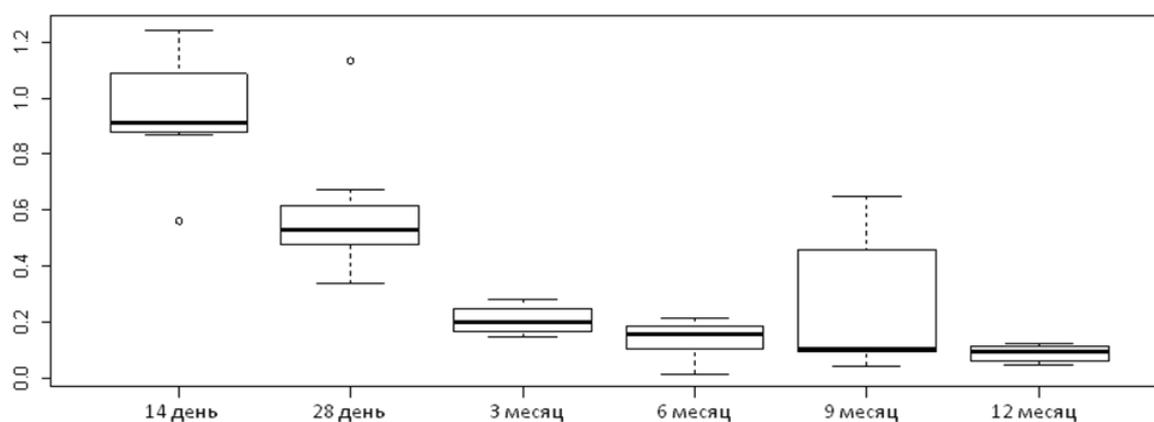


Рисунок 10. Процент KLTPLCVTL+ CD8+ Т-лимфоцитов среди всех CD8+ Т-лимфоцитов после однократной вакцинации. % KLTPLCVTL+ CD8+ Т-клеток показаны на оси Y. Сроки после вакцинации, на которые проводили замер, отображены на оси X

Gag-специфические CD8+ Т-лимфоциты были обнаружены у семи из двенадцати (58 %) вакцинированных «КомбиВИЧвак» участников на протяжении I фазы клинических испытаний. SLYNTVATL+ CD8+ Т-клетки появляются на низких уровнях у всех добровольцев в группе с однократной вакцинацией на 6-й или 9-й месяц испытания, но лишь у 50 % участников количество этих клеток превышает фоновый уровень (0,2 % – 0,5 %) (табл. 1).

Таблица 2

Результаты определения ВИЧ-специфических CD8+ Т-лимфоцитов у добровольцев, вакцинированных «КомбиВИЧвак» с использованием двух МНС-пентамерных комплексов после двукратной вакцинации. В таблице приведено количество SLYNTVATL+ CD8+ и KLTPLCVTL+ CD8+ Т-лимфоцитов и процент (в скобках) от общего числа CD8+ Т-лимфоцитов в пробе

Код добровольца	14 день		28 день		14-сутки после 2-й вакцинации		28-сутки после 2-й вакцинации		3 месяца		6 месяцев		9 месяцев		12 месяцев	
	SLY	KLT	SLY	KLT	SLY	KLT	SLY	KLT	SLY	KLT	SLY	KLT	SLY	KLT	SLY	KLT
2/16	1 (0)	61 (1,6)	24 (0,2)	71 (0,6)	0 (0)	31 (0,5)	0 (0)	21 (0,5)	5 (0)	114 (0,4)	1 (0)	35 (0,6)	9 (0,2)	7 (0,1)	0 (0)	9 (0,2)
2/17	1 (0)	52 (1,9)	0 (0)	121 (0,7)	0 (0)	43 (0,4)	5 (0,1)	5 (0,1)	1 (0)	43 (0,3)	4 (0,1)	22 (0,4)	2 (0)	9 (0,1)	0 (0)	0 (0)
2/23	0 (0)	161 (3,0)	0 (0)	12 (0,3)	0 (0)	17 (0,4)	25 (0,3)	11 (0,1)	0 (0)	42 (0,3)	4 (0)	42 (0,3)	1 (0)	12 (0,1)	1 (0)	0 (0)
2/27	2 (0,1)	44 (1,4)	0 (0)	43 (1,3)	0 (0)	3 (0,3)	61 (1,4)	13 (0,3)	1 (0)	30 (0,5)	56 (0,5)	44 (0,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0,1)
2/30	1 (0)	87 (1,3)	0 (0)	26 (1,0)	0 (0)	39 (0,6)	2 (0)	14 (0,1)	58 (0,3)	2 (0)	3 (0)	62 (0,5)	3 (0)	8 (0,1)	3 (0)	13 (0,1)
2/31	0 (0)	97 (1,1)	1 (0)	83 (0,6)	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.
Медианное значение	0	1,7	0	0,75	0	0,4	0,1	0,1	0	0,3	0	0,5	0	0,1	0	0,1

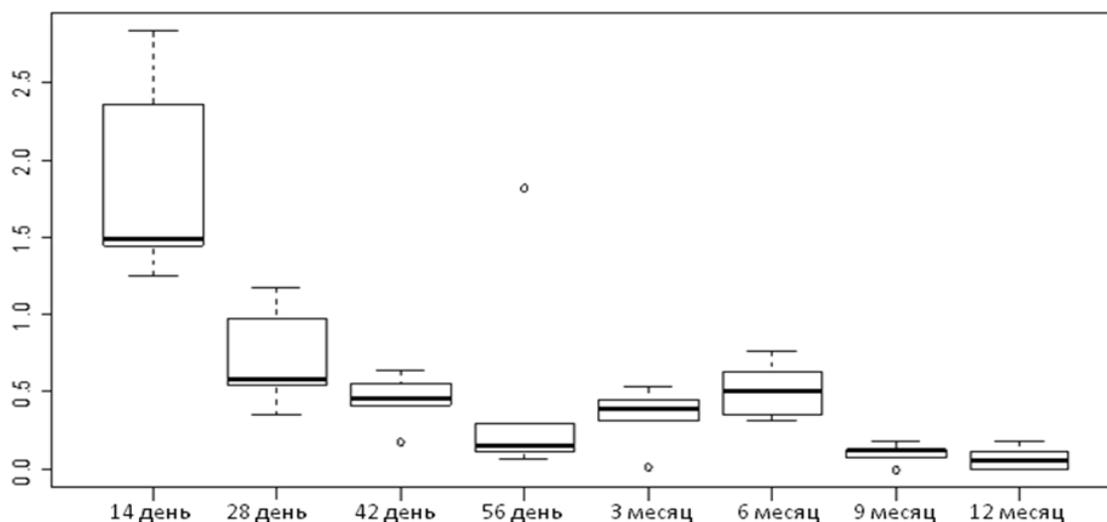


Рисунок 11. Процент KLTPLCVTL+ CD8+Т-лимфоцитов среди всех CD8+ Т-лимфоцитов после двукратной вакцинации. % KLTPLCVTL+ CD8+ Т-клеток показаны на оси Y. Сроки после вакцинации, на которые проводили замер, отображены на оси X

В группе двукратно вакцинированных SLYNTVATL+ CD8+ Т-лимфоциты определяются в количестве 0,2 % у одного из шести добровольцев на 28-й день от начала клинических испытаний (табл. 2). Вторая иммунизация «КомбиВИЧвак» стимулировала образование Gag-специфических CD8+

Т-лимфоцитов на уровнях, отличающихся от фонового, у двух из шести добровольцев (33,4 %) на 28-й день после повторного введения вакцины (табл. 2). В последующем SLYNTVATL+ CD8+ Т-лимфоциты определяются у одного из добровольцев в группе с двукратной вакцинацией на 3-й месяц (0,3 %), двух добровольцев из этой же группы на 6-й месяц (0,1 % и 0,5 %), и у одного – на 9-й месяц (0,2 %) от начала клинических исследований (табл. 2). Через год от начала эксперимента SLYNTVATL+ CD8+ Т-лимфоциты не обнаружены у участников в обеих группах, вакцинированных «КомбиВИЧвак» (табл. 1, 2).

В заключение следует отметить, что присутствие ВИЧ-1 Env- и Gag-специфических CD8+ Т-лимфоцитов в крови иммунизированных добровольцев на разных сроках I фазы клинических испытаний вакцины «КомбиВИЧвак» свидетельствует о том, что эпитопы белков ВИЧ-1 Env (KLTPLCVTL) и Gag (SLYNTVATL) в составе иммуногена TCI проходят правильный процессинг и презентацию CD8+ Т-лимфоцитам, обеспечивая формирование ВИЧ-специфических CD8+ Т-клеток.

ВЫВОДЫ

1. Получены ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие искусственные полиэпитопные Т-клеточные ВИЧ-1 иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3, спроектированные с учетом особенностей процессинга и презентации Т-клеточных антигенов. TCI-N представляет собой полиэпитопный фрагмент (общий для всех иммуногенов), в составе которого порядок эпитопов и спейсерные последовательности оптимизированы, как для протеасомного расщепления, так и для связывания эпитопов с ТАР. В составе иммуногена TCI-N2 полиэпитопный фрагмент содержит N-концевую сигнальную последовательность белка E3/gp19K аденовирусов и С-концевой тирозиновый мотив LAMP-1, а в составе иммуногена TCI-N3 – N-концевой убиквитин.

2. Полученные ДНК-вакцинные конструкции обеспечивают экспрессию генов, кодирующих целевые иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 *in vitro*, а также вызывают статистически значимые ($P \leq 0,05$) ответы ВИЧ-специфических CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN γ - и IL-2 у мышей линии BALB/c.

3. Показано, что присоединение N-концевого убиквитина (в составе TCI-N3) или N-концевой сигнальной последовательности белка E3/gp19K аденовирусов и С-концевого тирозинового мотива LAMP-1 (в составе

ТСI-N2) к последовательности полиэпитопного иммуногена (ТСI-N) вызывает статистически значимое ($P \leq 0,05$) повышение ВИЧ-специфических ответов CD4+ и CD8+Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN γ и IL-2, по сравнению с полиэпитопным иммуногеном TSI-N, не содержащим дополнительных сигнальных последовательностей.

4. Выявлено, что ДНК-вакцинная конструкция, кодирующая иммуноген TSI-N3, содержащий N-концевой убиквитин, индуцирует наиболее высокие статистически значимые ($P \leq 0,05$) уровни IFN γ - и IL-2-продуцирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов после трехкратной иммунизации по сравнению с конструкциями, кодирующими иммуногены TSI-N и TSI-N2.

5. С помощью пептид-МНС-пентамеров в рамках I фазы клинических испытаний вакцины «КомбиВИЧвак» показано формирование Env-специфических (KLTPLCVTL) CD8+ Т-лимфоцитов у 100 % и Gag-специфических (SLYNTVATL) CD8+ Т-лимфоцитов у 50 % HLA-A*0201-позитивных добровольцев.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка ВАК, рекомендованных для защиты диссертаций:

1. Карпенко Л.И., Мечетина Л.В., **Регузова А.Ю.** МНС-мультимеры и их применение в изучении противовирусного иммунного ответа // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 2. – С. 112 – 119.
2. **Регузова А.Ю.**, Антоненц Д.В., Максюттов Р.А., Волкова О.Ю., Карпенко Л.И., Ильичев А.А., Бажан С.И. Дизайн, конструирование и оценка экспрессии генов, кодирующих полиэпитопные Т-клеточные иммуногены ВИЧ-1 в составе ДНК-вакцинных конструкций // Вестник НГУ. – 2013. – № 2. – С. 5 – 12.
3. **Reguzova A.Y.**, Karpenko L.I., Mechetina L.V., Belyakov I.M. Peptide-MHC multimer-based monitoring of CD8 T-cells in HIV-1 infection and AIDS vaccine development // Expert Rev. Vaccines. – 2015. – V. 14. – N. 1. – P. 69 – 84.
4. **Reguzova A.**, Antonets D., Karpenko L., Ilyichev A., Maksyutov R., Bazhan S. Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T cell-epitope immunogens // PLOS ONE. – 2015. – V. 10. – N. 3. – P. e0116412.

Тезисы на всероссийских и международных конференциях:

1. **Регузова А.Ю.**, Антонец Д.В., Максютлов Р.А., Бажан С.И., Карпенко Л.И. Конструирование и биологическое тестирование ДНК-вакцильных конструкций, кодирующих структурные варианты искусственного поли-CTL-эпитопного иммуногена ВИЧ-1. Материалы Третьей Конференции по вопросам ВИЧ/СПИДа в Восточной Европе и Центральной Азии ЕЕСААС 2009, 28 – 30 октября 2009, Москва, Россия. – С. 125.
2. Бажан С.И., Карпенко Л.И., Антонец Д.В., **Регузова А.Ю.**, Максютлов Р.А., Ильичев А.А. Рациональный дизайн новых полиэпитопных ДНК-вакцин для индукции ответа CD8+ Т-лимфоцитов против ВИЧ-1. Материалы рабочего совещания по рассмотрению итогов выполнения распоряжения правительства РФ от 25.12.2007 г. № 1905-р., 17 – 19 ноября 2010, Новосибирск, Россия. – С. 160 – 168.
3. **Регузова А.Ю.**, Антонец Д.В., Максютлов Р.А., Бажан С.И., Карпенко Л.И. Конструирование и биологическое тестирование ДНК-вакцины, кодирующей оптимизированные поли-CTL-эпитопные ВИЧ-1 иммуногены. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири», 1 – 3 марта 2010, Красноярск, Россия. – С. 197 – 198.
4. Карпенко Л.И., Исаков И.В., Шакина Н.А., **Регузова А.Ю.**, Ильичев А.А. Разработка метода оценки специфической активности кандидатной вакцины против ВИЧ-1 с помощью техники МНС-тетрамеров. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Дни иммунологии в Сибири», 27–29 апреля 2011, Абакан, Россия. – С.172 – 173.
5. **Регузова А.Ю.**, Антонец Д.В., Максютлов А.З., Бажан С.И., Карпенко Л.И. Изучение биологических и иммунологических свойств оптимизированных искусственных Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов. III Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням, 28 – 30 марта 2011, Москва, Россия. – С. 309.
6. Karpenko L.I., **Reguzova A.Yu.**, Starostina E.V., Vorobova E.A., Antonets D.V., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. Artificial poly-CTL-epitopes DNA vaccines. The 8th International Conference on the Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS\SB-2012), 25 – 29 June 2012, Novosibirsk, Russia. – P. 87.
7. Карпенко Л.И., Рындюк Н.Н., Гинько З.И., Кузубов В.И., Лебедев Л.Р., Богрянцева М.П., Каплина О.Н., **Регузова А.Ю.**, Рыжиков А.Б., Усова С.В., Орешкова С.Ф., Масычева В.И., Нечаева Е.А., Ильичев А.А., Бажан С.И.

- Результаты I фазы клинических испытаний кандидатной вакцины против ВИЧ-1 (КомбиВИЧвак). Материалы научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней», 26 – 28 сентября 2013, Новосибирск, Россия. – С. 186 – 187.
8. **Регузова А.Ю.**, Антонец Д.В., Максютов Р.А., Ильичев А.А., Орешкова С.Ф., Бажан С.И., Карпенко Л.И. Конструирование полиэпитопных Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов и исследование их биологической активности в составе ДНК-вакцины. I Международный Форум «Инновации в медицине: основные проблемы и пути их решения. Высокотехнологичная медицина как элемент новой инновационной экономики», 22 – 23 марта 2013 г., Новосибирск, Россия. – С. 248 – 255.
 9. Karpenko L.I., Ryndyuk N.N., Gin'ko Z.I., Kuzubov V.I., Bazhan S.I., Lebedev L.R., Kaplina O.N., **Reguzova A.Yu.**, Ryzhikov A.B., Bogryantseva M.P., Usova S.V., Masycheva V.I., Nechaeva E.A., Ilyichev A.A. Phase I clinical trials of DNA-protein Vaccine (CombiHIVvac) Containing Artificial Multi-Clade Immunogens. International Conference «AIDS Vaccine 2013», 7 – 10 October 2013, Barcelona, Spain, OA03.02. – P. 61.
 10. **Reguzova A.Yu.**, Antonets D.V., Maksyutov R.A., Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. Design of artificial HIV-1 poly-CTL-epitope immunogens optimized for inducing CD8+ HIV-specific immune responses. 13th Young Scientist's Forum (YSF), 3 – 6 July 2013, St. Petersburg, Russia. – P.128.
 11. **Reguzova A.Yu.**, Antonets D.V., Maksyutov R.A., Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. Design of artificial HIV-1 poly-CTL-epitope immunogens optimized for inducing CD8+ HIV-specific immune responses. Federation of European Biochemical Societies FEBS CONGRESS 2013 “Mechanisms in Biology”, 6 – 11 July 2013, St. Petersburg, Russia. – P.128.
 12. **Reguzova A.Yu.**, Antonets D.V., Maksyutov R.A., Bazhan S.I., Karpenko L.I. Optimized Poly-CTL-epitope HIV-1 Immunogens for Inducing CD8+ HIV-specific Immune Responses. International Conference «AIDS Vaccine 2013», 7 – 10 October 2013, Barcelona, Spain, P13.32. – P. 286.