

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

Регузова Алёна Юрьевна

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

03.01.03 – «молекулярная биология»

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научные руководители:**

доктор биологических наук

Карпенко Лариса Ивановна

доктор биологических наук

Бажан Сергей Иванович

Кольцово 2015

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение	7
Научная новизна работы	9
Теоретическая и практическая значимость работы	10
Положения, выносимые на защиту	11
Апробация работы и публикации	11
Личный вклад автора	12
Благодарности	13
<b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	14
1.1. Мировой опыт по разработке вакцины против ВИЧ	17
1.2. Дизайн вакцины для индукции Т-клеточного иммунного ответа против ВИЧ-1	25
1.2.1. Особенности презентации Т-клеточных вакцин	25
1.2.2. Разрабатываемые полиэпитопные вакцины против ВИЧ-1 для индукции Т-клеточного ответа	28
1.2.3. Стратегии конструирования полиэпитопных вакцин	34
1.3. Методы исследования Т-клеточного иммунного ответа	40
1.3.1. Методы исследования Т-клеточной пролиферации	40
1.3.2. Методы исследования клеточной цитотоксичности	42
1.3.3. Методы определения цитокинов	44
1.3.4. Методы определения антиген-специфических Т-клеток, продуцирующих цитокины	45
1.3.5. Методы количественного определения антиген-специфических Т-клеток	49
Заключение по обзору литературы	53
<b>2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	54
2.1. Основные компоненты для приготовления питательных сред, реактивы, реагенты и прочие материалы	54
2.2. Плазмиды	55
2.3. Бактерии	55
2.4. Культура клеток	55

2.5. Растворы	55
2.6. Методы	58
2.6.1. Проектирование искусственных полиэпитопных Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3	58
2.6.2. Синтез генов и конструирование рекомбинантных плазмид	58
2.6.3. Трансформация клеток <i>E. coli</i> BL21 плазмидными ДНК	59
2.6.4. Нарботка препаративного количества рекомбинантных плазмидных ДНК	59
2.6.5. Выделение и очистка плазмидной ДНК	60
2.6.5.1 Лизис бактериальных клеток	60
2.6.5.2. Удаление РНК из раствора плазмидной ДНК	60
2.6.5.3. Осаждение плазмидной ДНК	61
2.6.5.4. Дробное фракционирование плазмидной ДНК этиловым спиртом	61
2.6.5.5. Очистка плазмидной ДНК от примесей низкомолекулярной РНК	62
2.6.5.6. Измерение концентрации раствора ДНК	62
2.6.6. Рестрикционный анализ плазмидной ДНК	62
2.6.7. Трансфекция эукариотических клеток сконструированными плазмидами	62
2.6.8. Электрофорез белков в полиакриламидом геле	63
2.6.9. Вестерн-блот анализ	64
2.6.10. Внутриклеточная детекция полиэпитопных белков TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 с использованием моноклональных антител, меченых FITC	65
2.6.11. Иммунизация лабораторных животных сконструированными ДНК-вакцинными конструкциями и сбор образцов для анализа	66
2.6.12. Исследование ВИЧ-специфического иммунного ответа у мышей линии BALB/c после ДНК-иммунизации	66
2.6.12.1. Выделение спленоцитов иммунизированных животных	66
2.6.12.2. Стимуляция спленоцитов иммунизированных животных	67
2.6.12.3. Внутриклеточное окрашивание цитокинов	67
2.6.13. Определение количества ВИЧ-1 Env- и Gag-специфических	68

CD8+ Т-лимфоцитов у вакцинированных добровольцев с использованием пептид-МНС-пентамеров	
2.6.14. Статистическая обработка полученных результатов	70
<b>3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	71
3.1. Проектирование искусственных ВИЧ-1 полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3	73
3.1.1. Выбор Т-клеточных эпитопов	73
3.1.2. Дизайн последовательности целевых Т-клеточных иммуногенов	78
3.1.3. Проектирование целевых Т-клеточных иммуногенов	80
3.1.4. Конструирование рекомбинантных плазмид, кодирующих полиэпитопные Т-клеточные иммуногены	82
3.1.5. Нарботка препаративного количества ДНК рекомбинантных плазмид	84
3.2. Изучение экспрессии целевых генов в клетках 293Т, трансфицированных рекомбинантными плазмидами	84
3.2.1. SDS-PAGE и вестерн-блот анализ	85
3.2.2. Внутриклеточная детекция полиэпитопных белков TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 с использованием моноклональных антител 29F2, меченых FITC	86
3.3. Исследование иммуногенности ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих полиэпитопные иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3	88
3.3.1. Иммунизация лабораторных животных сконструированными ДНК-вакцинами и сбор образцов	88
3.3.1.1. Выбор параметров для исследования ВИЧ-специфического иммунного ответа, индуцированного вакцинацией	89
3.3.1.2. Выбор метода и протокола для исследования ВИЧ-специфического иммунного ответа, индуцированного вакцинацией	90
3.3.3. Изучение способности искусственных полиэпитопных иммуногенов TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 стимулировать ВИЧ-специфические ответы CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов	96
3.3.4. Исследование влияния дополнительных сигнальных последовательностей в структуре полиэпитопных иммуногенов на	99

индукцию ВИЧ-специфических ответов CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов	
3.3.5. Выбор наиболее эффективной ДНК-вакцинной конструкции, стимулирующей наибольший уровень ВИЧ-специфического CD4+ и CD8+ Т-клеточного ответа	100
3.3.5.1. Исследование ВИЧ-специфического CD4+ Т-клеточного ответа в результате иммунизации ДНК-вакцинными конструкциями, кодирующими полиэпитопные иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3	100
3.3.5.2. Исследование ВИЧ-специфического CD8+ Т-клеточного ответа в результате иммунизации ДНК-вакцинными конструкциями, кодирующими полиэпитопные иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3	102
3.3.6. Можно ли путем оптимизации структуры иммуногена получить вакцину, которая по иммуногенности будет превосходить вакцины, полученные на основе нативных антигенов?	104
3.4. Исследование формирования ВИЧ-специфических CD8+ Т-лимфоцитов у добровольцев, иммунизированных вакциной «КомбиВИЧвак»	108
3.4.1. Описание вакцины и клинических испытаний	109
3.4.2. Определение Env- и Gag-специфических CD8+ Т-лимфоцитов у HLA-A*0201-позитивных добровольцев, вакцинированных «КомбиВИЧвак»	110
Заключение	117
Выводы	120
Список литературы	122

### Список сокращений

АПК – антиген-презентирующая клетка

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ИФА – иммуноферментный анализ

МКА – моноклональные антитела

ОТ-ПЦР – обратная транскрипция - полимеразная цепная реакция

п. н. – пар нуклеотидов

СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита

ТКР – Т-клеточный рецептор

Тх – Т-хелперы

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) – карбоксифлуоресцеинсукцимидиловый эфир

FBS (fetal bovine serum) – эмбриональная сыворотка плодов коров

HLA (human leukocyte antigen) – человеческий лимфоцитарный антиген

ICS (intracellular cytokine staining) – внутриклеточное окрашивание цитокинов

IFN $\gamma$  (interferon gamma) – интерферон гамма

IL-2 (Interleukin-2) – интерлейкин 2

LAMP-1 (lysosomal-associated membrane protein 1) – гликопротеин лизосомальной мембраны 1

MHC (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости

MVA (Modified Vaccinia Ankara) – модифицированный вирус осповакцины Ankara

PBMC (peripheral blood mononuclear cells) – периферические мононуклеарные клетки крови

PBS (Phosphate buffered saline) – натрий-фосфатный буфер

TAP (transporter associated with antigen processing) – транспортер, ассоциированный с антигенным процессингом

TLR (Toll-like receptor) – Толл-подобные рецепторы

TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha) – фактор некроза опухолей альфа

## ВВЕДЕНИЕ

Современная антиретровирусная терапия позволяет снижать вирусную нагрузку у ВИЧ-инфицированных больных, замедляет прогрессирование инфекции и ее переход в стадию СПИДа. Однако применение таких препаратов не приводит к полной элиминации вируса (Shen and Siliciano, 2008; Chomont *et al.*, 2009). В связи с этим задача создания вакцины против ВИЧ чрезвычайно актуальна.

Первые положительные результаты получены в клинических испытаниях комбинированной вакцины против ВИЧ-1 RV144 (разработка фирм VaxGen и Sanofi Pasteur), 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. Более того, 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 ранее полученных данных, согласно которым CD8+ ЦТЛ являются эффективными медиаторами противовирусного иммунного ответа. Недавно было показано, что индуцированный вакцинацией ВИЧ-специфический CD8+ Т-клеточный ответ способен контролировать репликацию вируса ВИЧ-1 на модели животных (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 (Koup and Douek, 2011). Этот подход теоретически позволяет преодолеть антигенную изменчивость ВИЧ, фокусирует иммунные ответы на протективные эпитопы и позволяет

исключить из состава вакцины нежелательные детерминанты, которые способны индуцировать аутоантитела или антитела, увеличивающие инфекционность вируса.

В настоящее время опубликовано достаточно много работ, посвященных конструированию и исследованию специфической активности искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов (Belyakov *et al.*, 1998; 2001; 2004; 2006; 2007; 2012; Berzofsky *et al.*, 2001; Bazhan *et al.*, 2004; 2010; 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 МНС I и МНС II классов дает основу для рационального дизайна полиэпитопных вакцин, индуцирующих ВИЧ-специфический Т-клеточный ответ.

Очевидно, что 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. Чтобы определить параметры протективного ВИЧ-специфического клеточного иммунного ответа, который должен быть сформирован в результате вакцинации, требуется всесторонне охарактеризовать ответ ЦТЛ. 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 данной 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<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с помощью метода пептид-МНС-пентамеров у добровольцев, вакцинированных «КомбиВИЧвак».

Для достижения указанных целей были поставлены следующие задачи:

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<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.
4. Изучить формирование Env- и Gag-специфических CD8<sup>+</sup> 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 С-концевого тирозинового мотива LAMP-1 (в составе TCI-N2) к последовательности Т-клеточного

иммуногена (TCI-N) повышает уровень антиген-специфического CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-2 и IFN $\gamma$ .

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<sup>+</sup> 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 С-концевых сигнальных последовательностей, увеличивающих уровень процессинга и презентации выбранных эпитопов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> 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 $\gamma$ - и IL-2-продуцирующих CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у добровольцев на I фазе клинических испытаний.

### **Апробация работы и публикации**

По материалам диссертации опубликованы 4 статьи в журналах из списка ВАК, рекомендованных для защиты диссертаций.

Результаты работы были представлены на международных и российских конференциях: на Третьей конференции по вопросам ВИЧ/СПИДа в Восточной Европе и Центральной Азии ЕЕСААС 2009, Москва, 2009 г.; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири», Красноярск, 2010 г.; Рабочем совещании по рассмотрению итогов выполнения распоряжения правительства РФ от 25.12.2007 г. № 1905-р, Новосибирск, 2010 г.; III Ежегодном Всероссийском

конгрессе по инфекционным болезням, Москва, 2011 г.; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири», Абакан, 2011 г.; 8th International Conference on the Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS\SB-2012), Новосибирск, 2012 г.; Научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней», Новосибирск, 2013 г.; I-ом Международном форуме «Инновации в медицине: основные проблемы и пути их решения. Высокотехнологичная медицина как элемент новой инновационной экономики», Новосибирск, 2013 г.; International Conference «AIDS Vaccine 2013», Барселона, 2013 г.; 13th Young Scientist's Forum (YSF), Санкт-Петербург, 2013 г.; Federation of European Biochemical Societies FEBS CONGRESS 2013 "Mechanisms in Biology", Санкт-Петербург, 2013 г.

### **Личный 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<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов продуцировать IL-2 и IFN $\gamma$ , выполнены автором лично.

Дизайн аминокислотной последовательности полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов был выполнен в теоретическом отделе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» канд. биол. наук Антоном 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<sup>+</sup> 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 Антоном Д.В. в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

### **Благодарности**

Автор диссертации приносит благодарность своим коллегам по отделу и сотрудникам ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», в тесном сотрудничестве с которыми была выполнена диссертационная работа, а именно: Антонцу Д.В., Ильичеву А.А., Орешковой С.Ф., Смирновой О.Ю., Каплиной О.Н., Старостиной Е.В., Слесаренко Л.В., Петьковой О.И, Хлистуновой Л.А., Блиновой Н.Н.

Автор благодарен канд. биол. наук Лактионову П.П. и сотрудникам его лаборатории молекулярной медицины ИХБФМ СО РАН за помощь в разработке протоколов выделения и очистки рекомбинантных плазмид, сотруднику Института медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» д-р биол. наук Лебедеву Л.Р. за помощь в получении и очистке белковых компонентов реактивов, использовавшихся в экспериментальной работе, а также сотрудникам питомника лабораторных животных ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

## 1. ОБЗОР ЛИТАРАТУРЫ

Вирус иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) со времени своего открытия инфицировал более 60 миллионов людей (Cohen *et al.*, 2008). Терминальная фаза ВИЧ-инфекции – синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) является основной причиной смертности населения ряда стран Центральной и Южной Африки (Cohen *et al.*, 2008). Согласно последнему отчету ЮНЭЙДС, в 2012 г. в мире проживало 35,3 миллиона ВИЧ-инфицированных людей, из них 1,6 миллиона человек умерло в 2012 г. (UNAIDS report, 2013). В России в последние годы отмечается высокий уровень распространения ВИЧ-инфекции (Покровский и др., 2013). Сегодня распространенность ВИЧ в России составляет 463 случая на 100 000 населения (из устного доклада Министра Здравоохранения РФ В.И. Скворцовой на Четвертой конференции по вопросам ВИЧ/СПИДа в Восточной Европе и Центральной Азии, Москва, 12-13 мая 2014 г.). В Новосибирской области заболеваемость ВИЧ составляет 140 случаев на 100 тысяч населения, при этом отмечено увеличение показателя заболеваемости за 2013 г. по сравнению с предыдущим на 23,3 %. Среднегодовой темп прироста ВИЧ инфекции в Новосибирской области составляет 10,8 % и характеризуется выраженной тенденцией к росту (отчет Новосибирского областного центра по профилактике и борьбе со СПИД за 2013 г.; <http://spidnso.ru/index.php/professionals>).

Не отрицая успехи антиретровирусной терапии и важности всего спектра мер борьбы с распространением ВИЧ, остановить инфекцию можно лишь путем вакцинации. В связи с этим разработка вакцины против ВИЧ является крайне важным направлением современной биологии и медицины.

Задача создания эффективной вакцины против ВИЧ-1 чрезвычайно сложна. Это связано, прежде всего, со следующими факторами: высокой антигенной изменчивостью ВИЧ-1, размножением ВИЧ в клетках иммунной системы, недостаточностью наших знаний об иммунных механизмах защиты от ВИЧ-инфекции, отсутствием адекватных экспериментальных моделей ВИЧ-инфекции на животных, способностью отдельных белков ВИЧ-1 индуцировать механизмы иммуносупрессии и иммунопатологии, сложностями в

организации и проведении клинических испытаний, которые требуют много времени, больших ресурсов и затрат.

Первые обнадеживающие статистически значимые результаты были получены в клинических испытаниях RV144, в которых комбинированная вакцина, состоящая из двух компонентов – AIDSVAX B/E gp120 (VaxGen) и ALVAC-HIV (Sanofi Pasteur), оказалась на 31,2 % эффективнее по сравнению с плацебо (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009). Несмотря на относительно низкую эффективность защиты, клинические испытания RV144 позволили сделать ряд важных выводов, в том числе: а) вакцина против ВИЧ-1 это не миф, а реальность; б) эффективная вакцина должна индуцировать как гуморальный В-клеточный, так и Т-клеточные ответы против ВИЧ-1; в) для повышения эффективности вакцины требуются более совершенные способы доставки вакцины и стратегии иммунизации. Кроме того, стало очевидно, что для проектирования ВИЧ-вакцин необходимы новые нетрадиционные подходы.

В связи с появлением современных методов иммунологии стало возможным идентифицировать и предсказывать в вирусных белках иммунологически значимые Т- и В-клеточные антигенные детерминанты, консервативные среди различных вирусных субтипов, и использовать их для конструирования искусственных полиэпитопных иммуногенов в качестве элементов вакцин. Данный подход представляется перспективным для создания нового поколения ВИЧ-вакцин, теоретически позволяет преодолеть антигенную изменчивость ВИЧ-1, фокусирует иммунные ответы на протективные детерминанты и позволяет исключить из состава вакцины нежелательные детерминанты, которые способны индуцировать аутоантитела или антитела, увеличивающие инфекционность вируса.

В рамках данной работы будут рассматриваться вопросы, связанные с созданием только полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов. Идея создания Т-клеточных вакцин против ВИЧ-1 основана на ранее полученных данных, согласно которым CD8+ ЦТЛ являются эффективными медиаторами противовирусного иммунного ответа. Известно, что CD8+ ЦТЛ способны супрессировать вирусную репликацию и принимать участие в элиминации инфицированных клеток (Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994; Jin *et al.*, 1999;

Schmitz *et al.*, 1999; Saez-Cirion *et al.*, 2007). Недавно было показано, что стимулированный вакцинацией ВИЧ-специфический CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ способен контролировать репликацию ВИЧ-1 на модели животных (Mudd *et al.*, 2012). Кроме того, прогрессирование ВИЧ-инфекции связано с дисфункцией CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (Appay *et al.*, 2000; McKay *et al.*, 2002; Acierno *et al.*, 2006), а увеличение CD8<sup>+</sup> Т-клеточного ответа ассоциируется со снижением вирусной нагрузки в фазе острой инфекции (Borrow *et al.* 1994; Коур *et al.* 1994). Т-клеточные вакцины против ВИЧ имеют цель ограничить трансмиссию и прогрессирование заболевания через индукцию выраженного и функционально значимого Т-клеточного ответа.

Важная роль в формировании Т- и В-клеточного иммунного ответа принадлежит CD4<sup>+</sup> Т-клеткам. Поэтому эффективный клеточный иммуноген должен содержать эпитопы для стимуляции ответа как CD8<sup>+</sup> ЦТЛ, так и CD4<sup>+</sup> Т-хелперов.

В настоящее время опубликовано достаточно много исследований, посвященных конструированию и исследованию активности искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов (Belyakov *et al.*, 1998; 2001; 2004; 2006; 2007; 2012; Berzofsky *et al.*, 2001; Bazhan *et al.*, 2004; 2010; 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 тоже время остается много нерешенных вопросов, связанных с выбором оптимальных стратегий проектирования высоко иммуногенных полиэпитопных конструкций. Прогресс в определении CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеточных эпитопов ВИЧ-1 и понимание особенностей процессинга эндогенно синтезирующихся антигенов по пути МНС I и МНС II рестрикции дает основу для рационального проектирования полиэпитопных вакцин, индуцирующих ВИЧ-специфический Т-клеточный ответ.

Разработка и исследование различных стратегий проектирования полиэпитопных иммуногенов, обеспечивающих эффективный Т-клеточный ответ, имеет большое значение как для создания вакцин против высоко вариабельных патогенов, так и для получения фундаментальных знаний о механизмах иммунного ответа на искусственные полиэпитопные белки.



### 1.1. Мировой опыт по разработке вакцины против ВИЧ

История создания вакцины против ВИЧ насчитывает уже 30 лет и представляет собой череду успехов и разочарований (Esparza, 2013). Высокая изменчивость ВИЧ-1, способность вируса ускользать от действия адаптивного иммунитета, раннее формирование латентного вирусного резервуара и отсутствие ясных иммунных коррелятов защиты – все это представляет собой огромную проблему на пути разработки вакцины.

В базе данных Международной инициативы по разработке вакцины против ВИЧ/СПИДа (IAVI) зарегистрировано 218 клинических испытаний, которые были проведены с 1988 г. по 2012 г. Большинство исследований относились к I фазе клинических испытаний, в ходе которых исследовались безопасность и иммуногенность кандидатных вакцин (IAVI report, 2012). Исследования включали различные подходы, с использованием прайм-буст комбинации белков или пептидов, поксвирусных векторов, ДНК-вакцин, аденовирусных векторов и др. Больше половины из этих испытаний (около 140), были осуществлены в США, остальные испытания были проведены в Европе, Африке и Таиланде (Pitisuttithum *et al.*, 2006; 2010). Только пять вакцин перешли к фазе IIb/III для испытания эффективности (McKinnon and Card, 2010; Saunders *et al.*, 2012).

Можно выделить три этапа исследований по созданию вакцин против ВИЧ-1, в основу которых были заложены разные подходы к конструированию вакцинного препарата (Esparza and Osmanov, 2003; Esparza *et al.*, 2006). Рассмотрим концепции, на основе которых разрабатывались вакцины против ВИЧ-1 (по Esparza, 2013).

*Первый этап: создание иммуногена, индуцирующего вируснейтрализующие антитела (1988-2003 гг.)*

Первая концепция, на основе которой создавались вакцины против ВИЧ-1, заключалась в получении антигенов, способных индуцировать гуморальный иммунный ответ, т.е. выработку вирус-специфичных антител. Считалось, что вакцина, которая будет способна индуцировать вируснейтрализующие антитела, сможет обеспечить защиту против ВИЧ-инфекции. Такая концепция основывалась на предыдущем опыте создания успешных вакцин против

вирусных заболеваний, (например, таких, как натуральная оспа), которые вызывают индукцию специфических антител и блокируют инфекцию (Plotkin, 2010).

Большинство первых вакцин против ВИЧ, которые были протестированы на животных и людях в 1980-х и начале 1990-х гг., были основаны на использовании в качестве антигенов поверхностных гликопротеинов вируса (gp120 или gp160), которые ответственны за связывание вируса с клеткой и служат главной мишенью для нейтрализующих антител. Однако в 1994 г. на модели обезьян было показано, что индуцированные ВИЧ-вакциной специфические антитела были способны нейтрализовать лабораторные штаммы ВИЧ-1, но не первичные клинические изоляты, выделенные у пациентов (Cohen, 1994).

Тем не менее, компания VaxGen решила осуществить первые масштабные клинические испытания вакцины против ВИЧ-1, которые были проведены в 2003 – 2004 гг. (Flynn *et al.*, 2005; Pitisuttithum *et al.*, 2006). Компания VaxGen позиционировала свои вакцины против ВИЧ-1 как профилактический препарат, в основу которых легли два рекомбинантных белка из gp160/gp120 различных субтипов ВИЧ-1. Вакцины получили название AIDSVAX B/B и AIDSVAX B/E (Adis International Ltd., 2003).

III фаза клинических испытаний AIDSVAX B/B была проведена в Канаде и США, а также частично в Нидерландах и Пуэрто-Рико в 2002 г. В исследование были вовлечены 5108 мужчины, имеющих половые контакты с мужчинами, и 309 женщины из групп риска, все добровольцы являлись ВИЧ-негативными на момент начала исследований. На протяжении 36 месяцев добровольцы получили в общей сложности семь инъекций на 0-й, 1-й, 6-й, 12-й, 18-й, 24-й и 30-й месяцы. В 2003 г. VaxGen объявил, что AIDSVAX B/B оказалась неэффективной в испытаниях, проведенных в Северной Америке и Европе, так как вакцина не защищала от ВИЧ-инфекции. Исследование не выявило статистически значимого снижения темпов распространения ВИЧ-инфекции в исследуемой популяции в целом, где уровень инфицирования составлял 6,7 % среди 3598 вакцинированных и 7,0 % среди 1805 плацебо. Также не было выявлено существенных различий в уровнях вирусной нагрузки у ВИЧ-инфицированных участников данного испытания (Flynn *et al.*, 2005).

III фаза клинических испытаний вакцины AIDSVAX B/E проводилась в Таиланде. В испытаниях принимали участие 2500 ВИЧ-негативных потребителей внутривенных наркотиков. Общий уровень заболеваемости ВИЧ-1 в этой группе составил 3,4 инфекции на 100 человек за год. Вакцина оказалась на 0,1 % эффективнее по сравнению с плацебо (Pitisuttithum *et al.*, 2006).

*Второй этап: создание иммуногена, индуцирующего ВИЧ-специфический Т-клеточный иммунный ответ (1995 – 2007 гг.)*

Поскольку результаты клинических испытаний вакцин VaxGen, направленных на формирование специфических антител к белкам оболочки ВИЧ-1, оказались неэффективными, интерес исследователей переключился на конструирование антигенов, способных индуцировать Т-клеточный иммунный ответ (Watkins, 2008).

В начале 2000-х гг. был опубликован ряд работ, демонстрирующих важность CD8+ Т-клеточного ответа в борьбе с ВИЧ-инфекцией (McMichael *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2007; Walker, 2007). Было проведено множество исследований для того, чтобы понять динамику клеточных иммунных реакций при вирусных инфекциях на моделях животных (McMichael *et al.*, 2000; 2001; 2010; Mudd *et al.*, 2012). Взаимосвязь между возникновением ВИЧ-специфического CD8+ Т-клеточного ответа и снижением вирусной нагрузки в фазе острой инфекции была показана рядом исследователей. Эта взаимосвязь обусловлена способностью CD8+ ЦТЛ ингибировать репликацию вируса и принимать участие в элиминации инфицированных клеток (Walker *et al.*, 1986; Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 1999; Saez-Cirion *et al.*, 2007). Показано также, что CD8+ Т-клетки памяти в течение длительного времени могут персистировать в периферийных лимфоидных тканях в активированном состоянии и выполнять непосредственный иммунный надзор (Masopust *et al.*, 2001). Все эти исследования обеспечили убедительные доказательства того, что индукция CD8+ ЦТЛ является важным компонентом защиты от ВИЧ-1 (McMichael, 2003).

Был разработан ряд кандидатных вакцин, направленных на стимуляцию Т-клеточного иммунного ответа, с использованием в качестве систем доставки живых рекомбинантных вирусных векторов (включая, поксвирусные и

аденовирусные векторы), а также ДНК-векторов (Schoenly and Weiner, 2008; Barouch, 2010; Pantaleo *et al.*, 2010).

Наиболее масштабные клинические испытания – фаза IIb Step study (HVTN 502/Merck 023) – прошла вакцина MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef субтипа В, в состав которой входили три рекомбинантных вектора на основе аденовируса 5-го серотипа: MRKAd5gag, MRKAd5pol, и MRKAd5nef. Конструирование векторов было проведено путем замены области E1 аденовируса Ad5 на генетическую конструкцию, содержащую цитомегаловирусный промотор, гены *gag*, *pol*, или *nef* ВИЧ-1 субтипа В и последовательность polyA. I фаза клинических испытаний представляла собой мультицентровое, рандомизированное, плацебо-контролируемое испытание с гомологичной трехкратной прайм-буст иммунизацией. В испытаниях приняли участие 259 ВИЧ-негативных добровольцев преимущественно из групп риска из 4-х регионов (Северная и Южная Америка, Австралия и острова Карибского моря). Было показано формирование ВИЧ-специфического клеточного ответа у большинства вакцинированных добровольцев, в частности, с помощью метода ELISpot (Frances *et al.*, 2008).

Фаза IIb Phambili (HVTN 503) клинических испытаний вакцины MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef проводилась с участием ВИЧ-1 серонегативных участников из пяти регионов Южной Африки. Вакцина вводилась трехкратно в виде внутримышечных инъекций на 0-й, 1-й и 6-й месяцы. В испытаниях участвовали 800 добровольцев, получавшие вакцину либо плацебо. Анализ данных, полученных по завершению испытаний в 2007 г., показал, что в группе вакцинированных за прошедший период 34 участника инфицировались ВИЧ-1, а в группе плацебо – только 28. Было отмечено, что большее число ВИЧ-инфицированных наблюдалось среди вакцинированных добровольцев, у которых до вакцинации были зафиксированы высокие титры (больше, чем 1:200) нейтрализующих антител к Ad5. Таким образом, не было получено доказательств протективности вакцины. Статистическая обработка результатов показала, что эффективность вакцины не изменяется с учетом титра антител к Ad5, пола, возраста добровольцев или эффекта обрезания (Gray *et al.*, 2011).

Тем не менее, Национальные Институты Здоровья США (НИН) решили провести клинические испытания HVTN-505 еще одной вакцины, получившей название DNA/rAd5, на основе Ad5 и ДНК-вакцины. Схема вакцинации включала три иммунизации ДНК-вакциной, кодирующей белки Gag, Pol, Nef ВИЧ-1 субтипа В, и белок Env субтипов А, В, и С, и последующее бустирование вакциной на основе вектора Ad5, кодирующего белки Gag и Pol субтипа В и белок Env субтипа А, В, и С (Hammer *et al.*, 2013). В исследовании приняли участие 2504 добровольца из групп риска. Испытания были начаты в 2009 г. и, первоначально, планировалось закончить их в 2015 г. Однако процесс был остановлен в апреле 2013 г., после того, как промежуточный анализ показал, что вакцина не смогла предотвратить инфицирование или сократить вирусную нагрузку у привитых добровольцев, которые стали ВИЧ-инфицированными. Так, на 28-й неделе от начала испытания, ВИЧ-инфекция была диагностирована у 27 участников из группы вакцинированных и у 21 – из группы плацебо. Последующий анализ всех ВИЧ-инфицированных в течение периода испытания (41 в группе реципиентов вакцины и 31 в группе плацебо) также свидетельствовал об отсутствии эффективности вакцины DNA/rAd5 (Hammer *et al.*, 2013).

Таким образом, ни испытания Step (HVTN-502/Merck-023), ни Phambili (HVTN-503), ни HVTN-505 НИН не смогли продемонстрировать способность профилактической вакцины против ВИЧ-1, направленной на стимуляцию только Т-клеточного ответа, предотвращать заражение вирусом или уменьшать уровень вирусемии (D'Souza and Frahm, 2010).

*Третий этап: создание иммуногена, индуцирующего как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ (с 2007 г.)*

В 2009 г. в ходе крупномасштабного исследования вакцины под названием RV144, проведенного в Таиланде, было показано, что именно комбинированный препарат способен обеспечить определенную защиту вакцинированных от инфицирования ВИЧ-1. В испытаниях RV144 была использована комбинация двух препаратов: вакцина ALVAC-HIV (vCP1521), предназначенная для стимуляции Т-клеточного ответа (разработка Aventis Pasteur), и вакцина AIDSVAX gp120 В/Е, предназначенная для индукции вирус-специфических

антител (разработка VaxGen). Для праймирующей иммунизации была использована ALVAC-HIV (vCP1521), полученная на основе живого рекомбинантного поксвирусного вектора, несущего гены белков ВИЧ-1 (*env*, *gag* и *pol*). Последующее бустирование проводилось с использованием AIDSVAX gp120 B/E, представляющей собой рекомбинантный белок gp120 B/E.

Это были самые масштабные клинические испытания III фазы с привлечением 16402 ВИЧ-негативных гетеросексуальных добровольцев, не относящихся к группам риска, в возрасте 18 – 30 лет. Исследование было разработано для оценки двух параметров: профилактика ВИЧ-1-инфекции и влияния вакцинации на показатели вирусной нагрузки после заражения. Иммунизацию вакциной ALVAC-HIV (vCP1521) проводили на 0-й, 4-й, 12-й и 24-й неделе. Бустирование AIDSVAX B/E производили на 12-й и 24-й неделе. Эффективность комбинированной вакцины ALVAC+AIDSVAX составила 31,2 %. Было показано, что вакцинация не влияет на степень виремии или количество CD4+ Т-лимфоцитов у добровольцев, у которых в последующем была диагностирована ВИЧ-1-инфекция (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009).

Проанализировав результаты клинических испытаний вакцины ALVAC+AIDSVAX (RV144) и ранее проведенных испытаний AIDSVAX B/E (VaxGen), не было обнаружено корреляции между титром нейтрализующих антител и защитой от инфицирования ВИЧ-1, была отмечена важная роль в протективной защите тех антител, которые не обладают нейтрализующей активностью, но участвуют в процессе антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (Wren and Kent, 2011; Alpert *et al.*, 2012; Yates *et al.*, 2014).

Кроме того, при сравнении результатов испытания RV144 и ранее проведенных испытаний AIDSVAX B/E (VaxGen), было показано, что в обоих клинических испытаниях вакцины индуцировали выработку антител, нацеленных против одного и того же участка оболочечного белка ВИЧ-1. Фактически, вакцина AIDSVAX B/E вызывала более высокий уровень большинства антител, чем сочетание прайм-буст вакцин в более успешном клиническом испытании RV144. Однако было установлено, что участники клинического испытания RV144

с большей вероятностью имели ВИЧ-специфические антитела IgG3, по сравнению с участниками более раннего испытания (Yates *et al.*, 2014).

В России также активно ведутся работы по созданию вакцины против ВИЧ-инфекции. ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России совместно с НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН авторы вакцины «ВИЧРЕПОЛ» – первой российской вакцины, успешно прошедшей I фазу клинических испытаний (Гудима и др., 2007; Gudima *et al.*, 2007; Korobova *et al.*, 2007; 2008). Созданная кандидатная вакцина «ВИЧРЕПОЛ» основана на рекомбинантном белке *gag*(24-41), конъюгированном с синтетическим иммуномодулятором полиоксидонием. Рекомбинантный антиген включает белки, кодируемые генами *gag* и *env*, (p24 + фрагмент gp41), которые являются консервативными для различных субтипов ВИЧ-1. Полиоксидоний является высокоэффективным безопасным иммуномодулятором нового поколения, разрешенным для клинического применения у человека. Вакцина «ВИЧРЕПОЛ» показала безопасность использования по результатам I фазы клинических испытаний и получила разрешение на проведение II фазы.

В Биомедицинском центре совместно с ГосНИИ ОЧБ (г. Санкт-Петербург) разработана ДНК-вакцина на основе преобладающего в России ВИЧ-1 субтипа А – «ДНК-4» (Мурашев и др., 2007). ДНК-вакцина «ДНК-4» представляет собой раствор для внутримышечного введения четырех плазмидных ДНК, кодирующих белки ВИЧ-1 Gag, RT, gp140 и Nef, с концентрацией суммарной рекомбинантной ДНК 1,0 мг/мл. Проведено лабораторно-экспериментальное изучение общетоксического действия, специфической активности и фармакокинетики вакцины против ВИЧ-1/СПИД «ДНК-4», показавшее иммуногенность и безопасность вакцины при введении лабораторным животным. Данная вакцина также прошла I фазу клинических испытаний получила разрешение на проведение II фазы.

В настоящее время большинство ученых сходятся во мнении, что успешная вакцина против ВИЧ-1 должна стимулировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет (Walker *et al.*, 2011). При этом индукция гуморального ответа может потребоваться для предотвращения заражения ВИЧ, в то время как ЦТЛ ответ может быть крайне необходимым для контроля вирусной репликации у

ВИЧ-инфицированных, ранее вакцинированных против ВИЧ-1 (Barouch *et al.*, 2012; Esparza, 2012).

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» была создана комбинированная вакцина «КомбиВИЧвак» на основе двух полиэпитопных иммуногенов для индукции В- и Т-клеточного иммунного ответа (Карпенко и др., 2003; 2006; 2007; Бажан и др., 2004; 2006; Ильичев и др., 2005; Karpenko *et al.*, 2007), ее структура подробнее будет описана ниже. В 2011 г. была завешена I фаза клинических испытаний вакцины «КомбиВИЧвак» и показана ее безвредность. Вакцина «КомбиВИЧвак» получила разрешение на проведение II фазы клинических испытаний.



## 1.2. Дизайн вакцины для индукции Т-клеточного иммунного ответа против ВИЧ-1

### 1.2.1. Особенности презентации Т-клеточных вакцин

Ключевым событием индукции Т-клеточного иммунного ответа против вирусных патогенов является распознавание иммунокомпетентными клетками чужеродных эпитопов, представленных на поверхности антиген-презентирующих клеток (АПК) в ассоциации с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) (Davis and Bjorkman, 1988). Схематически принцип индукции противовирусного Т-клеточного ответа представлен на рисунке 1.

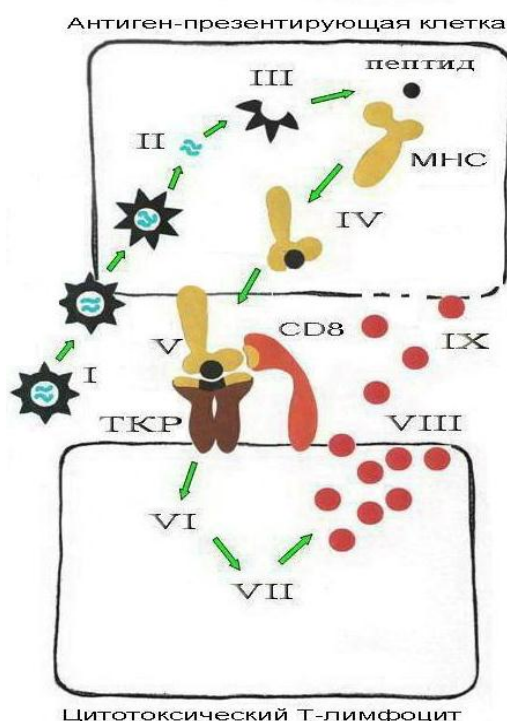


Рисунок 1. Схема распознавания и уничтожения цитотоксическим Т-лимфоцитом инфицированной вирусом клетки; I – проникновение вируса в клетку, II – высвобождение вирусной ДНК, III – синтез и процессинг вирусных белков, IV – формирование комплекса молекулы МНС I класса с вирусным пептидом, V – презентация комплекса пептид – молекула МНС I класса на поверхности клетки, VI – распознавание Т-клеточным рецептором (ТКР) вирусного пептида в комплексе с молекулой МНС I класса и передача сигнала активации, VII – активация цитокинов и цитотоксических агентов, VIII – высвобождение цитокинов и цитотоксических агентов, IX – разрушение клеточной мембраны и гибель клетки (по Карпенко и др., 2011)

При индукции Т-клеточного ответа предшественники эффекторных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов распознают вирусные антигены в виде коротких пептидов, которые после процессинга вирусных белков представляются на поверхности антиген-презентирующих клеток в комплексе с молекулами МНС I или МНС II класса. При этом специфичность Т-клеточного иммунного ответа обусловлена так называемым феноменом двойного распознавания, за открытие которого Цинкернагель и Догерти получили Нобелевскую премию в 1996 г. (Zinkernagel *et al.*, 1975). Сущность этого феномена заключается в том, что каждый вирусный пептид распознается в контексте определенной молекулы МНС строго специфичным к нему ТКР, локализованном на поверхности иммунокомпетентной клетки. CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты (Т-хелперы, Тх) распознают вирусные пептиды на поверхности АПК в комплексе с молекулами МНС II класса, в то время как CD8<sup>+</sup> ЦТЛ уничтожают инфицированные клетки, распознавая вирусные белки в комплексе с молекулами МНС I класса (Murali-Krishna *et al.*, 1999; Choo *et al.*, 2010).

В индукции ответа CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов принимают участие пептиды, образующиеся в инфицированных клетках в результате цитоплазматической деградации эндогенно продуцируемых вирусных белков по убиквитин-зависимому пути с участием протеасом. Образующиеся пептиды транспортируются TAP1/TAP2 гетеродимером в эндоплазматический ретикулум, где они ассоциируют с молекулами МНС I класса и  $\beta$ -микроглобулином (Ashton-Rickardt, 1993; Ashton-Rickardt *et al.*, 1993). Экзогенные белковые антигены, проникающие в АПК путем эндоцитоза, попадают в специализированный эндосомный компартмент клетки, где под действием эндосомных протеаз расщепляются и формируют комплекс с молекулой МНС II класса, который принимает участие в индукции ответа CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов.

После иницирующего прайминга большая часть предшественников антиген-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток подвергаются клональной экспансии (пролиферации и дифференцировке) и приобретают функции эффекторных CD8<sup>+</sup>ЦТЛ (Sprent *et al.*, 2002), а меньшая часть дифференцируется в длительно существующие вирус-специфические Т-клетки памяти, которые обеспечивают защиту при повторной встрече с вирусом (Amanna *et al.*, 2011).

Поскольку оптимальная индукция ответа CD8+ ЦТЛ происходит по пути МНС I класса, то в контексте создания Т-клеточной вакцины необходимо обеспечить эндогенную экспрессию вакцинного иммуногена (Koup and Douek, 2011). Использование плазмидной ДНК для доставки иммуногена в АПК *in vivo* является одним из самых прямых, хотя, вероятно, не самых эффективных методов для осуществления эндогенной экспрессии чужеродных белков. По сравнению с традиционными подходами ДНК платформа признана более безопасной и стабильной для создания вакцин. ДНК-плазмиды не встраиваются в геном клетки вакцинированного индивидуума и являются удобными векторами экспрессии генов, кодирующих целевые антигенные эпитопы. Кроме того, плазмиды относительно просты для производства в больших масштабах. Эта технология рассматривалась в качестве потенциальной современной замены живых ослабленных вакцин, способных вызывать полноценный иммунный ответ (Ferraro *et al.*, 2011). Четыре ДНК-вакцины были утверждены для применения в области ветеринарной медицины (Kutzler and Weiner, 2008) и согласно базе данных клинических испытаний IAVI (International AIDS Vaccine Initiative, 2013), с начала 2001 г. десять ДНК-вакцин против ВИЧ-1 находились на I фазе клинических испытаний (MacGregor *et al.*, 2002; Tavel *et al.*, 2007).

### 1.2.2. Разрабатываемые полиэпитопные вакцины против ВИЧ–1 для индукции Т-клеточного ответа

Существует относительно небольшое количество полиэпитопных ВИЧ вакцин для стимуляции вирус-специфических ЦТЛ, которые прошли I и II фазы клинических испытаний (табл. 1). Эти вакцины были, как правило, безопасны, но низко иммуногенны, вероятно, из-за слабой иммуногенности используемого вектора и ограниченного числа эпитопов, содержащихся в вакцине.

Таблица 1  
Клинические испытания I и II фазы ЦТЛ-полиэпитопных вакцин против ВИЧ-1 (по Sanou *et al.*, 2012)

Название и фаза клинического испытания	Место проведения испытания (кол-во участников)	Тип вакцины и схема иммунизации	Антигены ВИЧ	Субтипы ВИЧ	Супер-типы HLA	Выбор эпитопов	% ответивших участников в IFN $\gamma$ ELISpot	Ссылка
IAVI-001 (фаза I)	Великобритания, (18)	ДНК (0, 21 день)	гены p24/p17 (содержат Тх-эпитопы) +24 ЦТЛ-эпитопа (p24(6), Pol(6), Nef(8), Env(4))	Консенсусная последовательность Gag p24/p17 из субтипа А + ЦТЛ-эпитопы, присутствующие в 50–90% изолятов ВИЧ из субтипов А, В, С, D, Е, F, G, Н	A2, A3, A24, B7, B8, B27, B44	Наиболее распространенные в Кении субтипы ВИЧ-1. Консервативные эпитопы	78%	Mwau <i>et al.</i> , 2004; Cebere I. <i>et al.</i> , 2006
IAVI-002 (фаза I)	Кения (18)	ДНК (0, 21 день)					15%	Jaoko <i>et al.</i> , 2008
IAVI-003 (фаза I)	Великобритания, (8)	MVA (0, 21 день)					78%	Mwau <i>et al.</i> , 2004
IAVI-004 (фаза I)	Кения (18)	MVA (0, 1 или 0 месяц)					25%	Jaoko <i>et al.</i> , 2008
IAVI-011 (фаза II)	Швейцария, Великобритания, Южная Африка (81)	MVA (0, 2 месяц)					6%	Hanke <i>et al.</i> , 2007
IAVI-005 (фаза I)	Великобритания, (9)	прайм - ДНК (0, 21 день); буст - MVA					89%	Mwau <i>et al.</i> , 2004;
IAVI-006 (фаза II)	Великобритания, (119)	прайм –ДНК (0 месяц); буст – MVA (2, 3 или 5, 6 месяц)					12%	Hanke <i>et al.</i> , 2007
IAVI-008 (фаза I)	Кения (10)	прайм –ДНК (0, 21 день); буст – MVA (9, 10 месяц)					10%	Jaoko <i>et al.</i> , 2008
IAVI-009 (фаза II)	Уганда (50)	прайм –ДНК (0, 1 или 0 месяц); буст –					15%	Jaoko <i>et al.</i> , 2008

		MVA (5, 8 месяц)						
IAVI-010 (фаза II)	Кения, Велико- британия, (114)	прайм – ДНК (0, 1 месяц); буст – MVA (5, 8 месяц)					3%	Hanke <i>et al.</i> , 2007
IAVI-016 (фаза I)	Велико- британия, (24)	прайм – ДНК (0, 1 месяц); буст – MVA (2 или 0, 1 месяц)					50%	Goonetil- leke <i>et al.</i> , 2006
HVTN- 048 (фаза I)	США, Ботсвана (36)	ДНК (0,1,3,6 месяц)	21 ЦТЛ- эпитопа: Gag(4), Pol(8), Vpr(1), Nef(2), Rev(1), Env (5) + Тх- эпитопы	A, B, C, D, AE, AG	A2, A3, B7	Консер- ватив- ные эпитопы	13%	Gorse <i>et al.</i> , 2008

Под руководством Ханке и МакМитчэла была разработана кандидатная вакцина против ВИЧ, направленная на индукцию клеточного иммунитета (Mwaui *et al.*, 2004; Cebere *et al.*, 2006). Эта вакцина была разработана на основе иммуногена HIVA, который включал консенсусную последовательность Gag p24/p17 ВИЧ-1 субтипа А, присоединенную к последовательности ЦТЛ-эпитопов ВИЧ-1 субтипа А. Для доставки иммуногена использовались два вектора – ДНК (pTHr) и модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA). I фаза клинических испытаний этой вакцины была проведена в Великобритании (табл. 1). Восемнадцать добровольцев были вакцинированы только ДНК-компонентом вакцины – pTHr.HIVA (испытание IAVI-001), восемь других участников получали инъекцию только MVA.HIVA (испытание IAVI-003) и 9 добровольцев из первого испытания IAVI-001 через 9 – 14 месяцев после ДНК-праймирующей иммунизации получали вторую иммунизацию компонентом MVA.HIVA (испытание IAVI-005) (Cebere *et al.*, 2006).

Для анализа Т-клеточного иммунного ответа, индуцированного вакцинацией, применялся IFN $\gamma$  ELISpot. В результате было выявлено, что иммунизация только ДНК pTHr.HIVA вызывала ВИЧ-специфический ответ у 14 из 18 участников испытания, иммунизация компонентом на основе MVA стимулировала клеточный ответ у 7 из 8 добровольцев и иммунизация по схеме

ДНК прайм – MVA буст индуцировала ВИЧ-специфический ответ у 8 из 9 вакцинированных участников (Sebere *et al.*, 2006) (табл. 1).

Параллельно с исследованиями вакцины на основе иммуногена HIVA в Великобритании (IAVI-001, -003, и -005) (Mwau *et al.*, 2004; Sebere *et al.*, 2006), ряд испытаний были проведенными в Кении (IAVI-002, -004, и -008) и в Уганде (IAVI-009) (Jaoko *et al.*, 2008) (табл. 1). В испытании IAVI-002 применяли двукратную вакцинацию ДНК-вакциной рТНг.HIVA или плацебо с интервалом 21 день. В испытании IAVI-004 использовали двукратную вакцинацию MVA.HIVA или плацебо с интервалом 28 дней. В испытании IAVI-008 участвовали 10 добровольцев из IAVI-002, получившие через 32 недели после праймирующей иммунизации ДНК рТНг.HIVA бустирование в виде двух дополнительных инъекций MVA.HIVA с интервалом 28 дней. 11 участников испытания IAVI-004 получили третью дозу MVA.HIVA или плацебо через 18 месяцев после последней вакцинации (Jaoko *et al.*, 2008). В испытаниях IAVI-009 участвовало 50 человек. При этом 20 участников получали праймирующую инъекцию одной дозы ДНК рТНг.HIVA и затем одной дозы плацебо, 20 других участников получали две иммунизации ДНК рТНг.HIVA. В последующем все 40 добровольцев получали в качестве бустирующей иммунизации две дозы MVA.HIVA. 10 участников получали 4 инъекции плацебо (Jaoko *et al.*, 2008).

Результаты этих испытаний были разнородные (табл. 1). ВИЧ-специфический Т-клеточный IFN $\gamma$ -ответ хотя и был продемонстрирован, однако он был кратковременным. При этом вакцина стимулировала более высокие уровни IFN $\gamma$ -ответа у вакцинированных в Великобритании (78%, 88% и 89%), чем в Кении (15%, 33% и 10%) и Уганде (13%) (Sanou *et al.*, 2012). Последующие фазы исследования IAVI-006 и -010, которые были проведены с привлечением большего числа добровольцев, также показали низкую иммуногенность вакцины на основе иммуногена HIVA (Hanke *et al.*, 2007). Так, ВИЧ-специфический Т-клеточный ответ сформировался у менее чем 15 % участников испытаний. Было показано, что вакцинация только ДНК-компонентом рТНг.HIVA стимулировала в основном CD4+ Т-клеточный ответ, который был относительно слабый, а также CD8+Т-клеточный ответ.

Вакцина MVA.HIVA, используемая для бустирования, индуцировала более выраженный CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ (Hanke *et al.*, 2007) (табл. 1).

В испытаниях IAVI-016 одна группа добровольцев (N=8) получала две дозы MVA.HIVA или (N=4) 2 дозы плацебо. Вторая группа участников (N=8) получала две дозы рTHr.HIVA и затем одну инъекцию MVA.HIVA, либо три инъекции плацебо (N=4). Впоследствии в исследовании IAVI-016 8 из 8 (100 %) добровольцев, которые получали рTHr.HIVA-MVA.HIVA вакцинацию и 4 из 8 (50 %), которые получали две дозы MVA.HIVA, сформировали ВИЧ-специфический CD4<sup>+</sup> Т-клеточный IFN $\gamma$ -ответ (Goonetilleke *et al.*, 2006). Также 5 из 12 (42 %) участников испытаний продемонстрировали специфический CD8<sup>+</sup> Т-клеточный IFN $\gamma$ -ответ на ряд ЦТЛ-эпитопов (Sanou *et al.*, 2012).

В двух недавно проведенных клинических испытаниях вакцины на основе иммуногена HIVA изучали ее безопасность и иммуногенность у 48 здоровых младенцев в Гамбии, (испытание NCT00982579) и у 72 здоровых кенийских детей (испытание NCT00981695), рожденных у ВИЧ-1-инфицированных матерей. Полученные результаты показали, что иммунизация только ДНК-вакциной рTHr.HIVA не вызывает достаточного ВИЧ-специфического ответа (Afolabi *et al.*, 2013). Однако полученные данные свидетельствуют в пользу использования MVA, несущего также и другие гены белков ВИЧ-1, в качестве вектора для бустирования в составе более сложной прайм-буст стратегии вакцинации против ВИЧ-1 (Afolabi *et al.*, 2013).

В испытании HVTN-048 исследовали иммуногенность вакцины EP HIV-1090, которая представляет собой ДНК-плазмиду, кодирующую 21 ЦТЛ-эпитоп ВИЧ-1 и pan-DR Т-хелперный эпитоп (PADRE) (Gorse *et al.*, 2008). В I фазу клинических испытаний указанной вакцины были вовлечены 42 добровольца, имеющие хотя бы один аллель HLA, относящийся к супертипу MHC I класса, для которого была разработана вакцина EP HIV-1090, включая супертипы HLA-A2, -A3 и -B7. Участники получали внутримышечные инъекции ДНК-вакцины на 0-й, 1-й, 3-й и 6-й месяцы испытания, при этом доза вводимой плазмидной ДНК варьировала от 0,5 мг до 4 мг. Только у 1 из 8 (13 %) участников, получавших наибольшую дозу вакцины (4 мг), был обнаружен ВИЧ-специфический Т-клеточный ответ в IFN $\gamma$  ELISpot. С помощью метода

высвобождения хрома удалось показать наличие ответа CD8+ ЦТЛ еще у трех вакцинированных добровольцев, но эти ответы были кратковременны (Spearman *et al.*, 2009).

Отметим, что вакцины, приведенные в таблице 1, по мнению Саноу с соавторами, содержат недостаточное число выбранных ЦТЛ-эпитопов (21–77) (Sanou *et al.*, 2012). В целом, эти вакцины были неспособны индуцировать выраженный CD8+ Т-клеточный ответ. Это может быть связано с особенностями HLA-рестрикции участников испытаний, хотя для испытания полиэпитопной вакцины HVTN-048 отбирали добровольцев с наличием, по крайней мере, одного из аллелей HLA, предусмотренных в структуре вакцины. В испытаниях вакцины IAVI-009 ожидалось, что у каждого участника ВИЧ-специфические ответы будут индуцированы, по меньшей мере, на два-три CD8+ ЦТЛ-эпитопа.

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» была разработана комбинированная вакцина «КомбиВИЧвак», которая объединяет два полиэпитопных иммуногена TBI и TCI. Полиэпитопный белок TBI (T and B cell epitopes containing immunogen), другой – ДНК-вакцина (плазмида pcDNA-TCI), кодирующая полиэпитопный иммуноген TCI (Karpenko *et al.*, 2007). Белок TBI, содержащий четыре Т-клеточных эпитопа и пять В-клеточных эпитопов из белков ВИЧ-1 Env и Gag, сконструирован для стимуляции как гуморального, так и клеточного иммунного ответа (Eroshkin *et al.*, 1995). Белок TCI (T cell immunogen), содержащий более восьмидесяти эпитопов (как CD8+ ЦТЛ, так и CD4+ Тх) из основных вирусных белков Env, Gag, Pol и Nef, которые являются высококонсервативными для 3-х основных субтипов ВИЧ-1 (А, В и С) спроектирован для использования в качестве ДНК-вакцины, стимулирующей ВИЧ-специфический цитотоксический ответ (Bazhan *et al.*, 2004).

Вакцина «КомбиВИЧвак» представляет собой искусственные частицы, диаметром от 40 до 100 нм, в центре которых находится ДНК-вакцина pcDNA-TCI, а на поверхности – белок TBI, конъюгированный с полиглюкином (Lebedev *et al.*, 2000). Таким образом, частицы «КомбиВИЧвак» по своим размерам приближаются к размерам вирионов ВИЧ-1. Кроме того, оболочка из полиглюкина защищает ДНК-вакцину от действия нуклеаз и способствует повышению ее иммуногенности за счет увеличения вероятности захвата АПК.



Результаты доклинических исследований показали, что полиэпитопные иммуногены ТВІ и ТСІ в составе вакцины «КомбиВИЧвак» эффективно стимулируют вирус-специфический гуморальный и клеточный ответ (Karpenko *et al.*, 2007).

Вакцина «КомбиВИЧвак» прошла первую фазу клинических исследований (Регистрационный номер – RegNx 123539 RegWorkNx: 61708 ФГУ НЦЭСМП Росздравнадзора). В исследовании в качестве добровольцев приняли участие здоровые лица мужского (20 человек) и женского (10 человек) пола в возрасте от 18 до 49 лет. Добровольцы методом случайного выбора (рандомизация) 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. Данное исследование было одобрено Комитетом по этике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Все добровольцы подписали информированное согласие на участие в испытании.

В ходе испытаний была подтверждена безопасность вакцины, а также были исследованы некоторые аспекты иммуногенности. Вакцина «КомбиВИЧвак» получила разрешение на проведение II фазы клинических испытаний.

### 1.2.3. Стратегии конструирования полиэпитопных вакцин

Для преодоления антигенной изменчивости ВИЧ-1 и повышения иммуногенности полиэпитопных ДНК-вакцин, направленных на стимуляцию CD8+ Т-клеточного ответа, существует ряд подходов:

#### 1) *Использование множества консервативных эпитопов ВИЧ-1*

Проектирование эффективных вакцин должно основываться на использовании консервативных эпитопов из различных субтипов ВИЧ-1 для улучшения «иммунологического покрытия» в условиях большой вариабельности вируса (Borthwick *et al.*, 2014; Hanke, 2014). Оптимальные CD8+ Т-клеточные вакцины должны стимулировать ответы ЦТЛ против множественных антигенных детерминант ВИЧ-1 (Hanke, 2014; Karpenko *et al.*, 2014). Эта идея основывается на особенностях биологии данного вируса. Во-первых, учитывая высокую антигенную изменчивость ВИЧ-1, индукция иммунного ответа, ограниченного одной или несколькими детерминантами, будет не в состоянии защищать против инфекции, вызванной антигенными вариантами, и более того будет способствовать селекции таких антигенных вариантов, в результате чего такая вакцина не сможет обеспечить стерилизующий иммунитет. Во-вторых, генетическая вариабельность людей может приводить к тому, что ответы на любую данную детерминанту могут сильно отличаться по величине среди индивидуумов. В-третьих, имеются доказательства, что CD8+ Т-лимфоциты, специфичные к различным детерминантам, могут проявлять различную противовирусную активность (Spencer and Braciale, 2000).

#### 2) *Использование эпитопов, распознаваемых различными аллелями HLA*

Поскольку Т-клеточный иммунитет рестриктирован по антигенам МНС I и МНС II классов, проектирование вакцины, вызывающей Т-клеточный иммунный ответ, требует тщательного планирования для стимуляции иммунных реакций в контексте разнообразных HLA. Разнообразие молекул HLA варьирует у разных людей в одной популяции, а распространенность различных аллелей HLA также варьирует в разных популяциях. Поэтому проектирование Т-клеточных вакцин требует, чтобы выбранные эпитопы были рестриктированы различными аллелями молекул HLA, чтобы покрыть их генетическое разнообразие в популяции. Вакцины, содержащие эпитопы, которые могут быть презентированы

супертипами HLA, т. е. молекулами HLA, наиболее представленными в человеческой популяции, имеют больше шансов на успех. Так, например, Т-клеточная вакцина, построенная на основе эпитопов, рестриктированных тремя супертипами HLA-A2, A3 и B7, способна вызывать вирус-специфические Т-клеточные ответы у 80-90 % лиц мировой популяции (Sette and Sidney, 1998).

### *3) Повышение аффинных характеристик CD8+ ЦТЛ-эпитопов*

Повышение аффинных характеристик ЦТЛ-эпитопа можно осуществить несколькими путями:

- Повышение аффинности связывания эпитопов с молекулами МНС путем модификации последовательности эпитопов. Показано, что такой подход может сделать субдоминантный эпитоп доминантным, увеличивая его конкурентные способности связывания со свободными молекулами МНС (Pogue *et al.*, 1995; Berzofsky *et al.*, 2001);
- Повышение аффинности комплекса пептид-МНС к Т-клеточному рецептору. Улучшенные характеристики связывания комплекса пептид-МНС с Т-клеточным рецептором были получены на основе изменения последовательности пептида в работе Тангри и др. (Tangri *et al.*, 2001);
- Генерирование кросс-реактивных Т-клеток широкого спектра специфичности, эффективных в отношении большого количества вирусных штаммов. Этот подход был применен с использованием CD8+ ЦТЛ-эпитопа из варибельного сегмента белка Env ВИЧ-1, в котором замена одного аминокислотного остатка в ТКР-взаимодействующей области индуцировала кросс-реактивные ЦТЛ, которые распознавали множество вариантов ВИЧ-1 (Takahashi *et al.*, 1992).

### *4) Использование CD4+ Т-хелперных эпитопов, рестриктированных молекулами МНС II класса, для усиления ответа CD8+ Т-лимфоцитов*

Т-хелперы играют важную роль в стимулировании развития CD8+ Т-клеток, а также генерации Т-клеток памяти (Castellino *et al.*, 2006). Поэтому проектируемые полиэпитопные иммуногены кроме CD8+ ЦТЛ-эпитопов должны содержать CD4+ Т-хелперные эпитопы.

*5) Рациональная стратегия повышения иммуногенности вакцины должна обеспечивать максимальную экспрессию генов, кодирующих целевые иммуногены, эффективный процессинг продуктов экспрессии генов и презентацию*

освободившихся пептидов (эпитопов) CD8+ и CD4+ Т-лимфоцитам в комплексе с молекулами МНС I и МНС II класса, соответственно.

Накопленные результаты испытаний полиэпитопных вакцин позволяют задуматься относительно новых стратегий повышения их иммуногенности (Sanou *et al.*, 2012).

Современное понимание особенностей внутриклеточного процессинга и презентации антигенов создало предпосылки для рационального конструирования высоко иммуногенных Т-клеточных вакцин. В научной литературе накопилось достаточно много данных, свидетельствующих о корреляции успешности Т-клеточного иммуногена и эффективности его процессинга. Часто процессинг нативных вирусных антигенов является низкоэффективным. Из многих миллионов копий вирусного белка, синтезируемых внутри эукариотических клеток, генерируется небольшая часть пептидов, которые образуют комплексы с молекулами МНС I класса (Yewdell and Bennink, 1999). Было показано, что увеличение генерации таких комплексов АПК ведет к повышению их иммуногенности (Chen *et al.*, 2000). Наряду с этим описаны многочисленные методы модуляции трансляции антигенов и стратегии доставки интересующего антигена в различные клеточные компартменты (Ogata and Fukuda, 1994; Sandoval *et al.*, 1994; Anton *et al.*, 1997; Day *et al.*, 1997; Porgador *et al.*, 1997; Wu and Kipps, 1997; Rodriguez *et al.*, 1998; Ji *et al.*, 1999; Ishioka *et al.*, 1999; Uebel and Tampé, 1999; Delogu *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2000; Varshavsky *et al.*, 2000; Livingston *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2006; Cardinaud *et al.*, 2009; Weinberger *et al.*, 2013; Karpenko *et al.*, 2014). В связи с этим можно выделить несколько путей дизайна полиэпитопных иммуногенов, нацеленных на достижение максимальной экспрессии вакцинных эпитопов в комплексе с молекулами МНС I и МНС II класса.

А) Стратегии повышения МНС I-зависимой презентации:

- 1) *Нацеливание белков или полиэпитопных конструкций для протеасомного разрушения.* Это может быть достигнуто путем добавления к N-концу или C-концу белков убиквитина (Ub) и остатка Arg между Ub и белком, что впервые было показано Варшавским и коллегами (Varshavsky *et al.*, 2000). Именно присутствие полиубиквитиновой цепи распознается протеасомой и нацеливает субстрат на деградацию. Бажан с соавторами экспериментально показали, что N-концевой убиквитин для нацеливания полиэпитопных иммуногенов в протеасому для их деградации и освобождения эпитопов является более перспективной стратегией по сравнению с присоединением C-концевого убиквитина (Bazhan *et al.*, 2010). Уровень презентации эндогенного антигена точно соответствует его уровню деградации с помощью Ub-зависимого пути и нацеленные на деградацию формы антигена подвергаются более быстрому процессингу для презентации антигенов по пути МНС I класса (Grant *et al.*, 1995).
- 2) *Использование аминокислот, фланкирующих антигенные детерминанты, для эффективного протеасомального процессинга полиэпитопных конструкций.* Для полиэпитопных конструкций важно также предусмотреть влияние фланкирующих последовательностей на эффективность протеасомного высвобождения антигенных детерминант. В частности, Ишиока с соавторами показали, что изменение позиции эпитопов в составе минигенных вакцинных конструкций, кодирующих HLA-рестриктированные ЦТЛ-эпитопы, влияет на величину ответов CD8+ Т-лимфоцитов (Ishioka *et al.*, 1999). Ливингстоном с соавторами было показано, что иммуногенность эпитопа может модулироваться вставкой единственной аминокислоты, фланкирующей этот эпитоп с C-конца, и данный эффект обусловлен изменением эффективности процессинга. В частности, вставка единственного фланкирующего Lys значительно увеличивала ответ CD8+ Т-лимфоцитов на эпитоп. Сравнимые ответы наблюдались также на вставку остатков Arg, Cys, Asp, или Gly (Livingston *et al.*, 2001).
- 3) *Использование мотивов узнавания для ТАР.* Другим путем повышения иммуногенности вакцинных конструкций может быть использование мотивов

узнавания ТАР для фланкирования эпитопов в составе полиэпитопного иммуногена (Uebel and Tampé, 1999; Peters *et al.*, 2003; Cardinaud *et al.*, 2009). Взаимодействие пептидов с комплексом ТАР, как и связывание с молекулами МНС, является в достаточной мере специфичным и определяется аминокислотной последовательностью пептидов. Сайты расщепления белков протеасомой и иммунопротеасомой также во многом определяются аминокислотной последовательностью антигенов. В настоящее время известны вырожденные аминокислотные мотивы, определяющие эффективность сайтов протеасомного расщепления (Toes *et al.*, 2001) и мотивы, определяющие аффинность связывания олигопептидов с комплексом ТАР (Peters *et al.*, 2003; Doytchinova *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2011). Принципы распознавания ТАР были опубликованы Юбелем с соавторами (Uebel and Tampé, 1999) и данный подход использовался в работе Бажана с соавторами (Bazhan *et al.*, 2010) как один из путей повышения иммуногенности поли-ЦТЛ-эпитопных конструкций.

#### В) Стратегии повышения МНС II-зависимой презентации:

- 1) *Экспрессия определенных детерминант как минигенных продуктов, содержащих сигнальные последовательности для транспорта в эндоплазматический ретикулум (ЭР-нацеленные минигенные продукты).* В отличие от цитоплазматических минигенных продуктов, которые иногда с высокой эффективностью разрушаются протеасомами (Fu *et al.*, 1998; Luckey *et al.*, 1998), использование ЭР-сигнальных последовательностей является надежным методом для генерации комплексов антигенных пептидов с молекулами МНС II класса (Ciernik *et al.*, 1996; Anton *et al.*, 1997; Porgador *et al.*, 1997). Так как ЭР имеет крайне ограниченные способности для эндопротеолиза или для удаления С-концевых аминокислотных остатков (Snyder *et al.*, 1998), то ЭР-нацеленные минигены необходимо экспрессировать с индивидуальных промоторов.
- 2) *Использование мотива LAMP-1.* Показано, что присоединение LAMP-1 к С-концу белка E7 HPV-16 может нацеливать E7 антиген на клеточные эндосомальные/лизосомальные компартменты и способствовать его презентации по МНС-II пути (Wu *et al.*, 1995). Эта конструкция была

проверена в рамках ДНК-вакцины и показала формирование большего числа Е7-специфических CD4+ Т клеток, а также большей Е7-специфической ЦТЛ активности у мышей по сравнению с ДНК-вакциной, кодирующей белок Е7 дикого типа (Ji *et al.*, 1999). ДНК-вакцина, кодирующая антиген Gag ВИЧ-1, С-конец которого связан с LAMP-1, вызывала усиленный длительный гуморальный ответ, и ответы CD4+ и CD8+ Т-клеток памяти, сравнимые по уровню с ответами на белок Gag дикого типа (de Arruda *et al.*, 2004).

- 3) *Использование инвариантной цепи (Ii) молекулы МНС II класса.* Показано, что ДНК-плазида, кодирующая белок RT ВИЧ-1, к N-концу которого присоединена инвариантная цепь (Ii) молекулы МНС II класса человека (сигнал таргетинга в лизосому), обеспечивает транспорт синтезированного белка в лизосомы через эндоплазматический ретикулум. Данный подход позволил повысить уровень антиген-специфического Т-клеточного иммунного ответа в результате ДНК-иммунизации сконструированной плазмидой (Starodubova *et al.*, 2014).

Среди других стратегий повышения иммуногенности Т-клеточных вакцин следует упомянуть: использование оптимизированных кодонов и промоторов (Gao *et al.*, 2003; Barouch *et al.*, 2005; Pillai *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2009), совместное введение комбинации цитокинов (ГМ-КСФ+IL-12; CD86+ГМ-КСФ+IL-12; IL-15) (Disis *et al.*, 1996; Ahlers J.D. *et al.*, 1997; Barouch *et al.*, 2000; Belyakov *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2002; Boyer *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2006), использование модуляторов TLR, таких как CpG для ДНК-вакцин (Klinman *et al.*, 1996), использование альтернативных способов иммунизации (Lubeck *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1999; Nitayaphan *et al.*, 2004; Letourneau *et al.*, 2007), включая аутологичные дендритные клетки как систему доставки вакцины (Berzofsky *et al.*, 2001), частицы, покрытые ДНК (генная пушка) с внутримышечным и внутрикожным способом введения (Webster and Robinson, 1997; Hutnick *et al.*, 2011), электропорацию *in vivo* (Rosati *et al.*, 2008; Sardewsai and Weiner, 2011; Vasan *et al.*, 2011; Hutnick *et al.*, 2012) и бустирование различными векторами или рекомбинантными белками (Robinson *et al.*, 1999; Gorelick *et al.*, 2000; Amara *et al.*, 2002; Casimiro *et al.*, 2005), улучшение доставки ДНК-вакцины в АПК на основе липосом (Klavinskis *et al.*, 1997). Для того, чтобы повысить

иммуногенность полиэпитопных вакцин целесообразно использовать комплекс вышеперечисленных подходов (Sanou *et al.*, 2012).

### **1.3. Методы исследования Т-клеточного иммунного ответа**

Множество кандидатных вакцин было разработано для индукции ВИЧ-специфического Т-клеточного ответа. Для оценки протективного потенциала разрабатываемых вакцин необходимо развивать легко воспроизводимые стандартизованные методы количественного определения антиген-специфических Т-клеток и исследования их функционального профиля, сформировавшегося после иммунизации.

На этапе доклинических испытаний изучение иммуногенности вакцины проводят на моделях животных, и источником антиген-специфических Т-клеток в данном случае служат лимфоидные ткани, такие как селезенка, костный мозг и лимфатические узлы. На этапе клинических испытаний вакцины с привлечением добровольцев основным источником клеток для анализа являются периферические мононуклеарные клетки крови (РВМС), которые получают из венозной крови.

Для исследования CD8<sup>+</sup> Т-клеточного ответа используют разнообразные методы, в том числе: методы оценки Т-клеточной пролиферации, методы исследования цитотоксического потенциала и продукции цитокинов, методы иммунофенотипирования и количественного определения антиген-специфических Т-клеток (рис. 2) (Романович и Козлов, 2001; De Rosa, 2012; Saade *et al.*, 2012).

#### **1.3.1. Методы исследования Т-клеточной пролиферации**

Пролиферация периферических мононуклеарных клеток крови в краткосрочной культуре *in vitro* после стимуляции антигеном или пулом пептидов традиционно используется для исследования Т-клеточного иммунного ответа (Saade *et al.*, 2012). Пролиферацию Т-клеток наиболее часто оценивают, регистрируя включение клетками <sup>3</sup>Н-тимидина в ответ на стимуляцию специфическим антигеном (Barouch *et al.*, 1998). Этот метод имеет высокую чувствительность и довольно долго являлся «золотым стандартом» для изучения



пролиферативного ответа (Goodell *et al.*, 2007). Однако метод включения  $^3\text{H}$ -тимидина требует использования радиоизотопов и не дает информации о фенотипе и/или свойствах пролиферирующих клеток (Saade *et al.*, 2012), что делает его небезопасным и непригодным в крупномасштабных клинических испытаний для исследования иммуногенности вакцины.

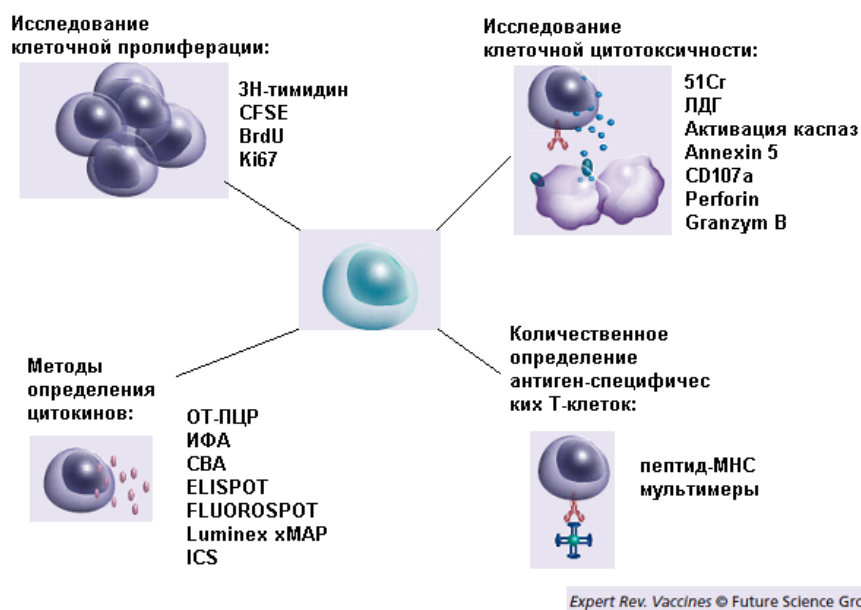


Рисунок 2. Методы исследования Т-клеточного иммунного ответа (по Saade *et al.*, 2012)

Более современные методы исследования клеточной пролиферации основываются на использовании безопасных клеточных красителей и проточной цитометрии. При этом отсутствует необходимость работы с радиоактивными материалами и появляется возможность одновременного окрашивания поверхностных клеточных маркеров у исследуемых эффекторных лимфоцитов и продуцируемых ими цитокинов. Среди этих методов наиболее часто применяется мечение клеточной мембраны лимфоцитов перед культивированием поглощаемой флуоресцентной меткой — CFSE (карбоксифлуоресцеинсукцимидиловый эфир), что позволяет определять антиген-специфическую Т-клеточную пролиферацию (Lyons and Parish, 1994; Lyons, 2000). РВМС могут легко окрашиваться CFSE и Т-клеточная пролиферации в результате антигенной стимуляции отражается в виде двукратного уменьшения флуоресценции в дочерних клетках при каждом делении. В результате последовательного снижения интенсивности окрашивания CFSE можно

определить до 8 клеточных делений. Тем не менее, анализ с помощью CFSE требует тщательной оптимизации с учетом потенциальной клеточной токсичности и вероятного модулирующего действия маркеров активации в культуре *in vitro* (Last'ovicka *et al.*, 2009).

Альтернативный метод для измерения Т-клеточной пролиферации основан включении 5-бром-2'-дезоксинуридина (BrdU) в ДНК, который впоследствии детектируется с помощью флуоресцентно-меченых антител к 5-бром-2'-дезоксинуридину (Leif *et al.*, 2004). Еще один метод для исследования Т-клеточной пролиферации – с использованием ядерного антигена Ki67, который выявляется в ядрах клеток в течение пролиферативной фазы клеточного цикла и поэтому может быть использован в качестве маркера делящихся клеток (Shedlock *et al.*, 2010).

Описанные методы оценки Т-клеточной пролиферации обладают высокой чувствительностью, в комбинации с антителами к поверхностным маркерам позволяют фенотипировать эффекторные клетки, но обладают высокой вариабельностью результатов даже в пределах одной лаборатории (Leroux-Roels *et al.*, 1994).

### **1.3.2. Методы исследования клеточной цитотоксичности**

Антиген-специфические ЦТЛ являются важнейшим медиатором противовирусного клеточного иммунного ответа благодаря их способности разрушать инфицированные вирусом клетки. Поэтому цитотоксический потенциал ЦТЛ является важным параметром для обеспечения эффективности вакцины. Активность ЦТЛ традиционно оценивалась методом высвобождения  $^{51}\text{Cr}$ . Этот тест основан на способности ЦТЛ лизировать меченые  $^{51}\text{Cr}$  клетки-мишени, экспонирующие антиген заданной специфичности (Brunner *et al.*, 1968). Так, в процессе инкубации клеток-мишеней с пептидами, имитирующими антигенные детерминанты белков ВИЧ-1, целевые клетки метят  $^{51}\text{Cr}$ . Затем меченые клетки-мишени инкубируют с эффекторными ЦТЛ в различных соотношениях. Когда ЦТЛ распознают и лизируют клетки-мишени,  $^{51}\text{Cr}$  высвобождается в супернатант, и его концентрация оценивается количественно. Хотя ранее данный метод был признан «золотым стандартом» для

измерения клеточной цитотоксичности, он имеет много недостатков, в том числе длительное время исследования, необходимость в большом количестве образца, использование радиоизотопов, высокая изменчивость результатов в рамках одного эксперимента, высокий фон из-за неспецифического высвобождения  $^{51}\text{Cr}$  из клетки-мишени и отсутствие возможности исследовать фенотип эффекторных клеток (Sun *et al.*, 2003; Zaritskaya *et al.*, 2010; Saade *et al.*, 2012).

В качестве альтернативы методу высвобождения  $^{51}\text{Cr}$  были разработаны тесты для определения клеточной цитотоксичности без использования радиоактивных материалов. Они основаны на определении маркеров дегрануляции эффекторных ЦТЛ или маркеров-индикаторов апоптоза или некроза клеток-мишеней. Один из последних методов – колориметрическое измерение лактатдегидрогеназной активности в культуральной среде. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) присутствует в цитоплазме всех эукариотических клеток и высвобождается в культуральную среду после повреждения/разрушения клетки (Korzeniewski *et al.*, 1983). Метод высвобождения ЛДГ сходен по принципу с методом высвобождения  $^{51}\text{Cr}$ , но имеет меньшую чувствительность (Decker *et al.*, 1988). Ограничением указанного метода также является невозможность определить фенотип эффекторных клеток.

Использование проточной цитометрии для изучения активности ЦТЛ имеет ряд преимуществ в виде относительно простых протоколов подготовки проб и возможности дальнейшего изучения поверхностных клеточных маркеров исследуемых клеток (Zaritskaya *et al.*, 2010). Проточная цитометрия может быть использована для определения активности ЦТЛ с применением антител к каспазам в клетках-мишенях, определения клеток в апоптозе с помощью флуоресцентно-меченого белка Annexin A5, либо поглощения флуоресцентных ДНК-зондов (7-AAD или пропидий йодид) (Zaritskaya *et al.*, 2010; Saade *et al.*, 2012). Наряду с этим, активность ЦТЛ также можно оценивать по дегрануляции путем определения маркера CD107a на поверхности CD8+ Т-клетки. CD107a обычно присутствует только на внутренних мембранах гранул CD8+ Т-лимфоцитов и детектируется на поверхности ЦТЛ только при дегрануляции (Betts *et al.*, 2003).

В настоящее время в качестве показателя цитотоксического потенциала ЦТЛ, сформировавшихся в результате иммунизации, широко используется метод внутриклеточного окрашивания перфорина и гранзимов с использованием флуоресцентно-меченых антител и проточной цитометрии (Takata and Takiguchi, 2006; Chattopadhyay *et al.*, 2009). Перфорин и несколько гранзимов (обычно гранзимы А и В), содержащиеся в цитолитических гранулах CD8<sup>+</sup> Т-клеток, особенно важны для реализации цитотоксических функций. Перфорин формирует в мембране клетки-мишени поры, что позволяет гранзимам попасть в клетку и индуцировать апоптоз (Barry and Bleackley, 2002). Преимущества данного метода заключается в возможности комбинировать определение клеточной цитотоксичности по продукции перфорина и гранзимов с детальным изучением фенотипа эффекторных ЦТЛ на уровне одной клетки.

### **1.3.3. Методы определения цитокинов**

Методы определения цитокинов представляют наиболее обширный класс и включают различные модификации подходов для исследования Т-клеточного ответа. Цитокины могут быть обнаружены как на уровне РНК с помощью ОТ-ПЦР, так и на уровне белка с помощью методов ИФА, ELISpot или ICS после *in vitro* стимуляции цельной крови или очищенных клеточных суспензий специфическими антигенами (Hutchings *et al.*, 1989).

Доступность коммерческих тест-систем ИФА позволяет оценивать широкий спектр различных цитокинов, как например IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF $\alpha$ , которые обычно используются в качестве ключевых маркеров ответа CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов – Th1 (Т-хелперы 1 типа) в иммунологических исследованиях вакцин (Han *et al.*, 2012), а также комбинации ряда цитокинов для определения других Т-клеточных популяций CD4<sup>+</sup> Т-клеток, как например Th2 (Т-хелперы 2 типа), Treg (Т-регуляторы), T17 (Т-хелперы 17) (Mosmann and Coffman, 1989; Yamane and Paul, 2012). Хотя традиционный ИФА ранее представлялся «золотым стандартом», с его помощью в одном образце можно определить только один цитокин в клеточной культуре после стимуляции Т-клеток специфическим антигеном, при этом необходимо большие объемы образца.

Позднее были разработаны методы для определения спектра цитокинов единовременно в небольших количествах образца. Так, цитометрический анализ с использованием частиц СВА (cytometric bead array) является одним из современных методов для исследования многих цитокинов и хемокинов одновременно в малом объеме сыворотки крови или клеточного супернатанта. В данном методе используются покрытые антителами частицы, где каждая частица имеет свои параметры флуоресценции для определения цитокина, к которому специфичны адсорбированные антитела (Carson *et al.*, 1999). Мультиплексные технологии с использованием таких частиц и проточной цитометрии позволяют детектировать различные цитокины в минимальном количестве образца ( $\geq 25$  мкл). Коммерчески доступная версия этого метода известна как Luminex xMAP, которая используется в настоящее время в лабораторных и клинических исследованиях. Технология Luminex может также применяться для определения цитокинов и молекул мРНК в образце, содержащем небольшие объемы цельной крови (Flagella *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2006).

Различные комбинации подходов для анализа профиля продуцируемых цитокинов с использованием частиц демонстрируют хорошую корреляцию с ИФА (Elshal and McCoy, 2006; Chowdhury *et al.*, 2009; Bomert *et al.*, 2011). Оптимизированный тест с использованием частиц и проточной цитометрии СВА даёт схожие результаты, полученные разными лабораториями (Dabitaio *et al.*, 2011), поэтому был использован в клинических испытаниях вакцины с участием добровольцев (Shebl *et al.*, 2010; Lalor *et al.*, 2011; Defawe *et al.*, 2012). Ограничениями данного метода являются недостаточная чувствительность для анализа продукции цитокинов редкими популяциями антиген-специфических клеток, а также невозможность получения информации о фенотипе цитокин-продуцирующих клеток (Saade *et al.*, 2012).

#### **1.3.4. Методы определения антиген-специфических Т-клеток, продуцирующих цитокины**

Метода ИФА и СВА позволяют оценивать общее количество цитокинов в культуре супернатанта, но не представляют возможности определить уровень продукции цитокинов на уровне одной клетки. ELISpot и внутриклеточное

окрашивание цитокинов (ICS) являются альтернативными методами, которые имеют значительные преимущества по сравнению с ИФА и СВА, так как позволяют исследовать продукцию цитокинов на уровне одной клетки, в связи с чем являются полезными для изучения иммунного ответа редких Т-клеточных популяций (Lehmann and Zhang, 2012).

ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot assay) – метод, представляющий собой модификацию ИФА, позволяющий определять и количественно оценивать антиген-специфические Т-клетки, секретирующие определенный продукт, например, IFN $\gamma$  (Czerkinsky *et al.*, 1988). Для этого периферические мононуклеарные клетки крови культивируют в присутствии антигена на поливинилиденфторидной или нитроцеллюлозной мембране с адсорбированными первыми антителами, специфичными к исследуемому цитокину. В результате стимуляции каждая антиген-специфическая клетка продуцирует цитокин, который связывается с иммобилизованными на мембране антителами. После этого клетки смываются и секретированные ими продукты определяются как окрашенные точки на мембране с использованием конъюгированных с ферментом вторых антител и хромогенного субстрата (Versteegen *et al.*, 1988). С помощью ELISpot возможно определить размер и интенсивность окрашивания точек, что коррелирует с количеством цитокина, секретированного каждой клеткой.

Таким образом, в то время как анализ ИФА дает количественную оценку общей продукции цитокинов, ELISpot подсчитывает непосредственное число антиген-специфических цитокин-секретирующих клеток в результате антигенной стимуляции.

ELISpot считается наиболее широко используемым стандартизованным методом для количественной оценки Т-клеточного иммунного ответа в клинических испытаниях вакцин, имеет хорошую воспроизводимость и высокую чувствительность, особенно для образцов с низким уровнем ответа (Karlsson *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009; Lehmann and Zhang, 2012). Наряду с этим, ELISpot удобен для использования в широкомасштабных клинических испытаниях, так как может быть выполнен как с использованием свежих, так и замороженных клеток (Smith *et al.*, 2001). Основным ограничением ELISpot

является то, что он не предоставляет информации о фенотипе эффекторных клеток помимо продукции цитокинов. Кроме того, в традиционном ELISpot одновременно может быть проанализирован только один параметр клетки, тогда как ICS позволяет измерять множество параметров.

Улучшенный вариант ELISpot – FLUOROSPOT, который позволяет проводить одновременную детекцию множества цитокинов на уровне одной клетки (Ahlborg and Axelsson, 2012). Принцип его похож на стандартный ELISpot, с разницей в том, что цитокины определяются с использованием флуоресцентно-меченых антител и подсчитываются с помощью флуоресцентного ELISpot-ридера, регистрирующего различные цвета (Gazagne *et al.*, 2003). Способность Т-клеток одновременно продуцировать два или более цитокина Th1 типа Т-хелперов, как например, IFN $\gamma$ , IL-2 или TNF $\alpha$ , считается, связана с контролем ВИЧ-инфекции (Harari *et al.*, 2004), что делает способность FLUOROSPOT детектировать одновременно несколько цитокинов на уровне одной клетки существенным преимуществом.

Современным и информативным методом для количественной оценки антиген-специфических Т-клеток и анализа их продуктов экспрессии является ICS на основе проточной цитометрии. Этот подход позволяет одновременно проводить иммунофенотипирование и исследовать широкий спектр цитокинов, которые клетки продуцируют в результате антигенной стимуляции при кратковременной инкубации *in vitro*.

Принцип ICS заключается в следующем: периферические мононуклеарные клетки крови активируют с использованием коктейля специфических пептидов, и культивируют с добавлением ингибитора транспорта белков (например, brefeldin A), чтобы предотвратить секрецию цитокинов из клетки в культуральную среду. После культивирования клетки отмывают, и проводят их фиксацию-пермеабелизацию с использованием параформальдегида, в результате чего в клеточной мембране образуются поры, через которые на этапе окрашивания проникают флуоресцентно-меченые антитела к исследуемым цитокинам. Результаты регистрируют на проточном цитометре. Благодаря развитию лазерной системы детекции в современных проточных цитометрах, позволяющих анализировать большой спектр флуорохромов, в настоящее время

возможно использование оптимизированных протоколов для анализа до 18 клеточных параметров в одном образце (Nomura *et al.*, 2007; Lovelace and Maescker, 2009).

Хотя IFN $\gamma$  ELISpot исторически являлся основным методом оценки иммуногенности ВИЧ-вакцин в клинических испытаниях, внутриклеточное окрашивание цитокинов сейчас также широко используется благодаря возможности измерения одновременно нескольких цитокинов с определением типа Т-клеточного ответа (De Rosa, 2012). Более того, благодаря гибкости и информативности, внутриклеточное окрашивание цитокинов выглядит более предпочтительным для исследования иммуногенности на этапе разработки вакцины, в то время как ELISpot – для иммунологического скрининга образцов в клинических испытаниях (Giulia *et al.*, 2013). Хотя ICS требует большее количество клеток для анализа образца, чем ELISpot, он позволяет провести более детальное изучение клеток, продуцирующих цитокины. ICS, как и ELISpot, может быть выполнен с использованием как свежих, так и замороженных клеток. Метод внутриклеточного окрашивания цитокинов обладает высокой чувствительностью, сопоставимой с методом ELISpot (Sun *et al.*, 2003).

ICS и мультипараметрическая проточная цитометрия были использованы для изучения корреляций иммунной защиты после вакцинации против многих патогенов человека и животных (De Rosa *et al.*, 2004; Cassataro *et al.*, 2005; Sopp *et al.*, 2006; Darrah *et al.*, 2007; Burgers *et al.*, 2009; Lindenstrom *et al.*, 2009; Aagaard *et al.*, 2011; Hope *et al.*, 2011; Lumsden *et al.*, 2011). С помощью ICS могут быть определены многие цитокины и хемокины в зависимости от ожидаемого ответа на вакцинный иммуноген. Для исследования ВИЧ-специфического клеточного ответа наиболее часто измеряют уровни цитокинов IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF $\alpha$ , продуцируемые CD4 $^{+}$  и CD8 $^{+}$  Т-клетками. Во время лабораторных исследований в рамках HIV Vaccine Trials Network (HVTN) часто проводят одновременный анализ клеток, продуцирующих IFN $\gamma$  и/или IL-2, что является общепризнанным показателем для количественной оценки Т-клеточного ответа (De Rosa, 2012). В дополнение к анализу продукции цитокинов и хемокинов, другие клеточные параметры могут быть оценены в ICS анализе. Они включают исследование цитотоксического потенциала путем измерения дегрануляции и анализа



внутреннего содержимого гранул, оценку хелперной способности путем измерения экспрессии лиганда CD40 (CD40L, также известный как CD154), а также определения фенотипических маркеров популяций антиген-специфических клеток, как например, Т-клетки памяти и эффекторные Т-клетки (Freer and Rindi, 2013).

В целом, на сегодняшний день ICS – единственный метод, позволяющий одновременно проводить количественную оценку антиген-специфических Т-клеток и исследовать их фенотип (Freer and Rindi, 2013). Сейчас прикладываются все усилия для стандартизации протоколов ICS, используемых для изучения иммуногенности разрабатываемых вакцин, чтобы получать сопоставимые результаты в различных лабораториях.

### **1.3.5. Методы количественного определения антиген-специфических Т-клеток**

Количественный и качественный анализ антиген-специфических Т-клеток необходим для детального исследования противовирусного Т-клеточного ответа. В последние годы успехи в иммунологии и биохимии позволили визуализировать и изолировать антиген-специфические Т-клетки благодаря появлению и развитию технологии пептид-МНС-мультимерных комплексов (Altman *et al.*, 1996; Dunbar *et al.*, 1998; Romero *et al.*, 1998). По сравнению с другими методами пептид-МНС-мультимеры обладают наибольшей чувствительностью для определения редких популяций антиген-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток и позволяют одновременно детально исследовать ко-экспрессию поверхностных клеточных маркеров (Dunbar *et al.*, 1998; Ogg and McMichael 1999, Sun *et al.*, 2003).

Этот метод основан на принципе распознавания Т-лимфоцитом через ТКР антигенного эпитопа в комплексе с молекулой МНС, но только в инвертированном виде: растворимые комплексы молекул МНС с вирусным пептидом, несущие флуоресцентную метку, добавляют к суспензии клеток. Пептид-МНС-мультимеры находят в этой смеси те Т-клетки, которые имеют соответствующий Т-клеточный рецептор. К примеру, используя пептид-МНС-мультимеры, а также анти-CD8 моноклональные антитела и широкий спектр антител к другим маркерам, представленным на поверхности

иммунокомпетентных клеток, можно выделить субпопуляцию антиген-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и провести их фенотипический анализ (Guillaume *et al.*, 2009).

На сегодняшний день разработаны пептид-МНС-мультимерные комплексы для исследования CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеток человека и экспериментальных животных (Reichstetter *et al.*, 2000; Vollers and Stern, 2008; Sims *et al.*, 2010). Наиболее часто используемые молекулы МНС-пептид I класса для изучения CD8<sup>+</sup> Т-клеточного ответа – МНС-тетрамеры.

Структура МНС-тетрамера представлена мономерами, каждый из которых состоит из тяжелой цепи молекулы HLA,  $\beta$ 2-микроглобулина и пептида, имитирующего вирусный эпитоп. Мономеры помечены биотином и соединены друг с другом при помощи стрептавидина, имеющего на своей поверхности сайты связывания биотина. Стрептавидин предварительно помечен флуоресцентным красителем, в качестве которого наиболее часто используется фикоэритрин (PE) или аллофикоцианин (APC). Этот флуоресцентный комплекс связывается со специфичным ТКР на поверхности иммунокомпетентной клетки при помощи целевого пептида, имитирующего вирусный эпитоп (рис. 3). Детекция окрашенных клеток проводится при помощи метода проточной цитофлуориметрии (Meidenbauer *et al.*, 2003; Altman, 2004).

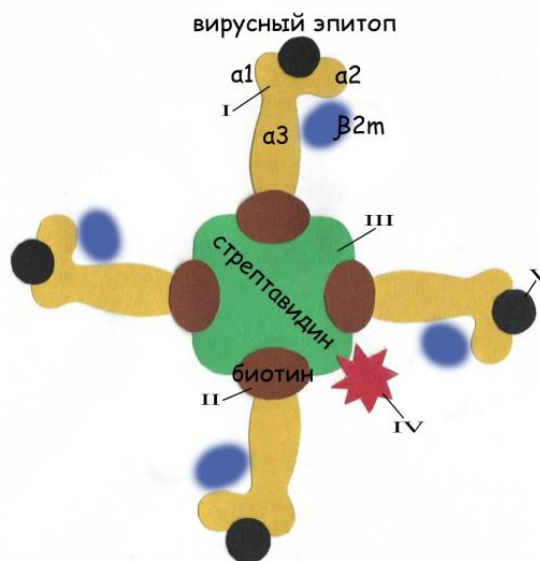


Рисунок 3. Схема строения МНС-тетрамера. I – рекомбинантная молекула МНС; II – биотин; III – стрептавидин; IV – флуорохром; V – пептид, имитирующий вирусный эпитоп (по Карпенко и др., 2011)

Технология пептид-МНС-мультимеров претерпела бурное развитие за последние 20 лет, начиная с использования мономерных МНС-пептидных комплексов, димерных, тетрамерных, пентамерных и заканчивая мультимерными комплексами на основе декстрана (Schmidt *et al.*, 2013; Reguzova *et al.*, 2015). Так, в 1993 г. была предложена методика мечения Т-лимфоцитов мономерными флуоресцентными комплексами МНС-пептид (Boniface *et al.*, 1998), однако она не нашла широкого применения из-за низкой аффинности Т-клеточного рецептора к лиганду (Luescher *et al.*, 1994; Luescher *et al.*, 1995). МНС-пептид димерные комплексы (на основе молекул МНС I класса) были получены в результате димеризации МНС-пептид мономеров в комплексе с молекулой IgG (Dalporto *et al.*, 1993). Первые МНС-пептид тетрамеры, которые применили для детекции и анализа вирус-специфических CD8+ Т-клеток, появились в 1996 г. (Altman *et al.*, 1996). В 1998 г. описаны первые МНС-мультимеры на основе молекул МНС II класса (Gutgemann *et al.*, 1998). В 2000 г. были заявлены пентамеры производства ProImmune (Великобритания), которые используют уже более стабильный комплекс из 5 молекул МНС I класса и 5 молекул PE (фикоэритрина). Данная технология продолжает развиваться, и в настоящее время доступны МНС-декстрамеры (рис. 4).

У метода пептид-МНС-мультимеров существует ряд достоинств. Во-первых, они позволяют быстро определить количество специфичных к определенному антигену Т-клеток (Figueiredo *et al.*, 2014). Во-вторых, отсутствует необходимость использовать радиоизотопы, а также культивировать и стимулировать клетки *in vitro*. В-третьих, очень высока специфичность и чувствительность данного метода. При использовании пептид-МНС-тетрамеров в комбинации с проточной цитометрией минимальный порог детекции составляет 0,01 – 0,02 % или 1:5000 (одна антиген-специфичная клетка на популяцию из 5000 CD8+ Т-лимфоцитов, или 1:50000 для периферических моноклеарных клеток крови) (Kleinerman *et al.*, 2002, Sun *et al.*, 2003). В-четвертых, сохранение целостности клетки позволяет использовать ее для дальнейшего анализа. Кроме того, важным достоинством этого метода является возможность одновременного детального изучения фенотипических и функциональных характеристик

анализируемой субпопуляции лимфоцитов с использованием панели антител к клеточным маркерам и проточной цитометрии (Bousso, 2000; Xu and Screenshot, 2002).

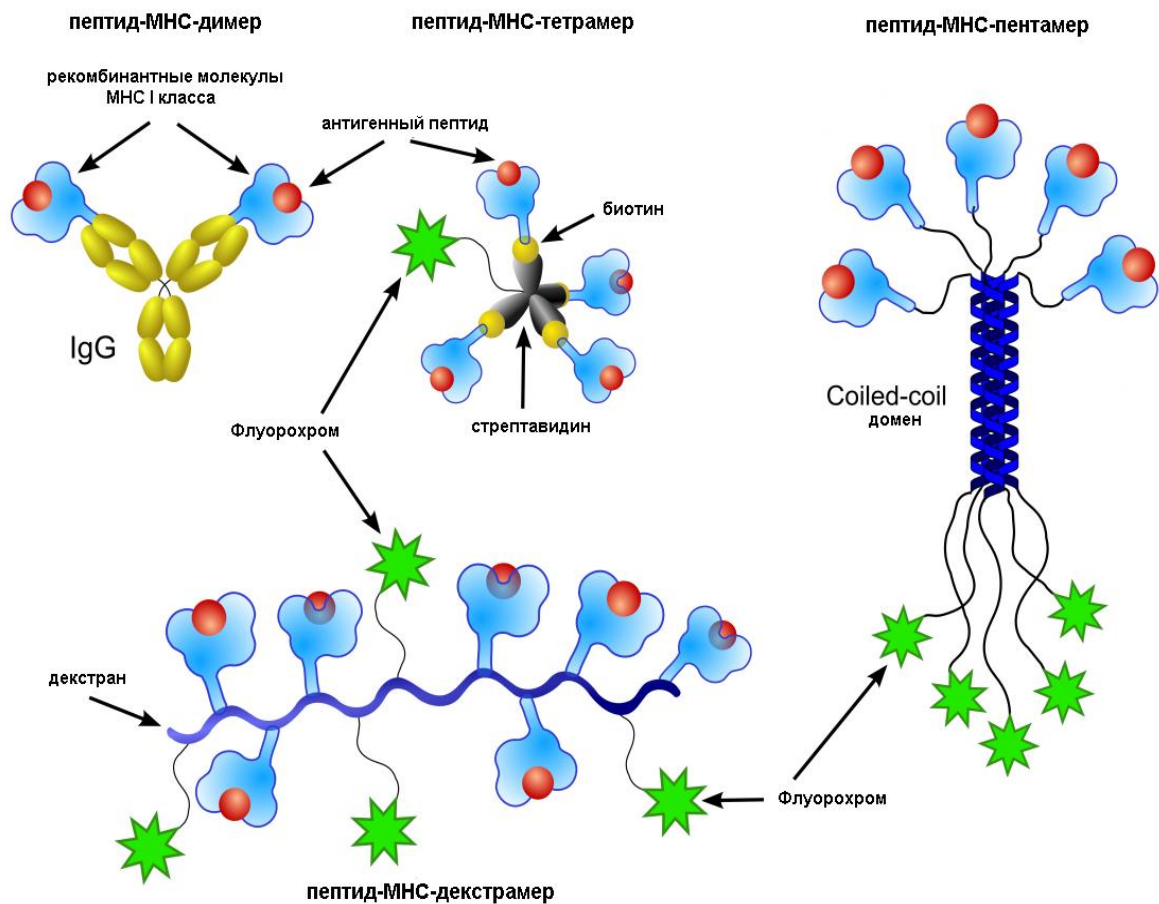


Рисунок 4. Эволюция МНС-пептидных комплексов (по Reguzova *et al.*, 2015)

Ограничением данного метода является то, что каждый МНС-пептидный комплекс является специфичным в отношении строго определенного эпитопа (Altman *et al.*, 1996; Davis *et al.* 2011). Вторая особенность метода обусловлена рестрикцией Т-клеточного ответа по антигенам главного комплекса гистосовместимости. Пептид-МНС-мультимеры способны выявлять Т-клеточные эпитопы, рестриктированные только одним аллелем МНС. Поэтому затруднительно использовать пептид-МНС-мультимеры при проведении крупномасштабных клинических испытаний в связи с многообразием типов HLA в человеческой популяции.

Пептид-МНС-мультимерные комплексы активно используются для анализа иммунного ответа при оценке эффективности разрабатываемых кандидатных ВИЧ-вакцин, в особенности, направленных на стимуляцию CD8<sup>+</sup> Т-клеточного

ответа (Reguzova *et al.*, 2015). Данная технология представляется крайне чувствительной для определения популяций ВИЧ-специфических CD8+ Т-клеток и может использоваться совместно с ИФА, ELISpot и рядом функциональных методов для изучения специфической активности вакцин (Sylvester-Hvid *et al.*, 2002; Malyguine *et al.*, 2007; Leisner *et al.*, 2008; Patch *et al.*, 2011).

### **Заключение по обзору литературы**

Накопленный опыт по созданию вакцины против ВИЧ показывает, что задача не может быть решена с помощью традиционных подходов. В связи с этим на первый план выходят альтернативные стратегии, в том числе основанные на конструировании искусственных полиэпитопных иммуногенов. Вопросы, касающиеся рационального конструирования полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов, влияния оптимизации их структуры на величину индуцируемого ВИЧ-специфического Т-клеточного ответа, а также способы повышения их процессинга в антиген-презентирующей клетке и презентации Т-лимфоцитам требуют углубленных исследований. Решению этих вопросов посвящена данная диссертационная работа.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Основные компоненты для приготовления питательных сред, реактивы, реагенты и прочие материалы

Продукты фирм-производителей, использованные в настоящей работе:

«**Sigma**», США: линкомицина гидрохлорид, ТЕМЕД (N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин), калия перхлорат, аммоний уксуснокислый, HCl, SDS (додецилсульфат натрия), калий уксуснокислый, 2-меркаптоэтанол, трис (гидроксиметил)-аминометан, этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль, РМА (форбол 12-миристанат 13-ацетат), I<sub>o</sub> (иономицин), DMSO (диметилсульфоксид), кумасси R-250, NBT (нитротетразолиевый голубой), пунцовый С, BCIP (5-бromo-4-хлоро-3'-индолофосфат), антивидовой конъюгат щелочной фосфатазы (анти-мышь);

«**Abcam**», Великобритания: anti-beta Actin antibody – Loading Control;

«**Amresco**», США: БСА (бычий сывороточный альбумин), ПСА (персульфат аммония);

«**Amersham**», Великобритания: нитроцеллюлозные фильтры Hybond-C;

«**AppliChem**», Германия: акриламид, N,N'-Метилен-бис-акриламид;

«**BD Biosciences**», США: Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit, моноклональные антитела – PerCP Rat Anti-Mouse CD4, FITC Rat Anti-Mouse CD8a, PE Hamster Anti-Mouse CD3ε, APC Rat Anti-Mouse IFN $\gamma$ , APC Rat Anti-Mouse IL-2;

«**Difco**», США: бактотриптон, агар;

«**Fluka**», Швейцария: дрожжевой экстракт, пептон;

«**Invitrogen**», США: липофектамин, инактивированная эмбриональная сыворотка плодов коров, гентамицин (раствор, 50 мг/мл);

«**ProImmune**», Великобритания: Pro5 МНС пентамеры I класса в комплексе с пептидами ВИЧ-1 Env D1 (KLTPLCVTL aa 120-128) и Gag 17A (SLYNTVATL aa 77-85), моноклональные антитела FITC-conjugated anti-human CD8;

«**Serva**», Германия: бромистый этидий, бромфеноловый синий, Tween-20, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота);

**ООО «БиолоТ»**, Россия: L-глутамин (сухой, стерильный, 150 мг/фл), раствор трипсина-версена (1:1), среда RPMI-1640, среда ДМЕМ;

**ОАО «Синтез»**, Россия: ампициллина натриевая соль, хлорамфеникол (левомецетина натрия сукцинат);

**ЗАО «Вектор-Бест»**, Россия: моноклональные антитела 29F2;

**ООО «Сибэнзим»**, Россия: эндонуклеазы рестрикции *BglII*, *HindIII*, *XhoI*; набор длин фрагментов ДНК (13 фрагментов от 0,25 до 10 kb).

**ОАО «Дальхимфарм»**, Россия: раствор глюкозы

Все остальные реактивы были произведены в ВО "Реахим" и имели квалификацию "ос.ч", "чда" и "хч".

## 2.2. Плазмиды

pcDNA3.1/Мус-His(+)/lacZ (Invitrogen, США);

pcDNA-TCI (Бажан С.И., ГНЦ ВБ «Вектор»);

pmaxGFP (Карпенко Л.И., ГНЦ ВБ «Вектор»).

## 2.3. Бактерии

Бактериальный штамм *E. coli* BL21 и *E. coli* DH5F' были получены из коллекции штаммов отдела «Коллекция микроорганизмов» ГНЦ ВБ «Вектор».

## 2.4. Культура клеток

Культура клетки почки человека линии 293T была получена из Института Цитологии и Генетики СО РАН (от Волковой О.Ю.)

## 2.5. Растворы

**Среда LB:** бактотриптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 10 г. Доводили объем раствора до 1 л, pH 7,2.

**Агаризованная среда StI:** пептон – 7,8 г, дрожжевой экстракт – 2,8 г, глюкоза – 1 г, агар – 15 г. Доводили объем раствора до 1 л, pH 7,2.

**Ампициллин** (100 мг/мл) в 50 % водном этаноле: 0,5 мг ампициллина растворяли в 2,5 мл стерильной воды, после чего добавляли 2,5 мл этилового спирта.

**Хлорамфеникол** (100 мг/мл) в 50 % водном этаноле: 0,5 мг левомецетина натрия сукцината растворяли в 2,5 мл стерильной воды, после чего добавляли 2,5 мл этилового спирта.

**1 М трис-НСl, рН 8,0:** для приготовления 100 мл буфера 12,1 г (0,1 моль) трис-НСl, растворяли в 60 мл дистиллированной воды, доводили рН концентрированной НСl до 8,0.

**CaCl<sub>2</sub>-буфер:** 50 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мМ трис-НСl, рН 8,0. Для приготовления 90 мл буфера: 5 мл 10 %-го (0,9 М) водного раствора CaCl<sub>2</sub> + 0,9 мл 1 М буфера трис-НСl, рН 8,0, доводили объем раствора стерильной водой до 90 мл.

### **Буферы для выделения плазмидной ДНК:**

**Буфер 1:** 25 мМ Трис-НСl, 20 мМ ЭДТА, рН 8,0. Для приготовления 1 л брали 3,03 г Трис-НСl, 7,44 г ЭДТА (динатриевая соль), растворяли в 800 мл бидистиллированной воды. Титровали до рН 8,0. Доводили объем раствора до 1 л. Хранили при 4 °С.

**Буфер 2:** 1 % SDS, 0,2 М NaOH. Для приготовления 1 л брали 10 г SDS, 8 г NaOH кристаллич. + 900 мл бидистиллированной воды. Доводили объем раствора до 1 л. Хранили при комнатной температуре.

**Буфер 3:** 3 М ацетат калия, рН 5,5. Для приготовления 0,5 л брали 147,21 г ацетата калия, растворяли в 300 мл бидистиллированной воды. Титровали ледяной уксусной кислотой до рН 5,5. Доводили объем раствора до 0,5 л.

**Раствор РНКазы А:** растворяли 50 мг РНКазы А в 1 мл Буфера 1, инкубировали 30 мин на кипящей водяной бане. Центрифугировали на настольной центрифуге Eppendorf 5415D при 16100 g и переносили супернатант в новую пробирку. Хранили замороженным в аликвотах по 500 мкл.

**Бромистый этидий** (10 мг/мл), водный раствор бромистого этидия, подкисленный НСl: взвешивали 10–20 мг бромистого этидия в пробирке типа Eppendorf на 1,5–2 мл, затем добавляли дистиллированную воду в объеме пропорционально массе – 1–2 мл и 20–30 мкл концентрированной соляной кислоты. Хранили при комнатной температуре.

**Трис-глициновый буфер:** 25 мМ трис рН 8,3, 192 мМ глицин, 0,1 % SDS.



**1,5 М Трис-НСl pH 8,8:** 18,15 г трис-НСl растворяли в 70 - 80 мл дистиллированной воды. Титровали раствором НСl до pH 8,8. Доводили общий объем раствора до 100 мл.

**0,5 М Трис-НСl pH 6,8:** 6,05 г трис-НСl растворяли в 70 - 80 мл дистиллированной воды. Титровали раствором НСl до pH 6,8. Доводили общий объем раствора до 100 мл.

**44 % акриламид:** 44 г акриламида и 0,8 г бис-акриламида растворяли в 80 мл дистиллированной воды при перемешивании на магнитной мешалке, доводили объем раствора до 100 мл.

**30 % акриламид:** 30 г акриламида и 0,8 г бис-акриламида растворяли в 80 мл дистиллированной воды при перемешивании на магнитной мешалке, доводили объем раствора до 100 мл.

**PBS pH 7,2:** на 1 л брали 8 г NaCl, 0,2 г KCl, 1,44 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (б/в), 0,2 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**PBS-T (0,05 %):** 200 мл 1 % PBS, 100 мкл Tween-20.

**Литический буфер (на 2 мл):** 0,5 мл 1 М Трис-НСl pH 6,8, 0,8 мл 10 % SDS, 0,4 мл глицерина 100 %, 0,2 мл 2-меркаптоэтанола, 0,1 мл раствора бромфенолового синего 1 %.

**Кумасси R-250:** для приготовления 200 мл взвешивали 400 мг кумасси R-250, растворяли в 20 мл этилового спирта, добавляли воды 80 мл (до 100 мл) и 25 мл хлорной кислоты, перемешивали, после чего доводили объём до 200 мл.

**AP буфер pH 7,5 (x10):** 43,88 г хлорида натрия растворяли в 400 мл дистиллированной воды, добавляли 5,1 г хлорида магния (MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O), после добавляли 30,3 г трис, 10 мкл Tween-20. После растворения всех компонентов титровали раствором соляной кислоты до pH 7,5 и доводили раствор до 500 мл. Хранили при 4 °C не более 6 месяцев.

**AP буфер pH 9,2 (x10):** 21,94 г хлорида натрия растворяли в 200 мл дистиллированной воды, после растворения добавляли 2,56 г хлорида магния (MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O) и 15,15 г трис. После этого раствор мутнел, при достижении нужного pH становился прозрачным. Титровали раствором соляной кислоты до pH 9,2 и доводили раствор до 250 мл. Хранили при 4 °C не более 6 месяцев.

**Буфер для переноса:** на 0,1 л брали 0,293 г глицина, 0,581 г трис, 70 мл дистиллированной воды, растворяли, доводили pH концентрированной НСl до

8,3–8,5, добавляли 20 мл 96 % этилового спирта, доводили объем до 100 мл. Хранили в холодильнике.

**Полная питательная среда RPMI-1640:** в 1 флаконе стерильной жидкой среды RPMI-1640 (450 мл) растворяли 1 флакон сухого L-глутамина (150 мг), добавляли 600 мкл раствора гентамицина (50 мг/мл), перемешивали. Полученный раствор хранили до 10 суток при температуре 4 °С.

**Раствор Бройля:** 0,83 г  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и 0,206 г трис растворяли в 100 мл дистиллированной воды, доводили pH до 7,6.

## 2.6. МЕТОДЫ

### 2.6.1. Проектирование искусственных полиэпитопных Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3

Предсказание Т-клеточных эпитопов и дизайн аминокислотной последовательности генов полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 был выполнен в теоретическом отделе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Д.В. Антонцом с использованием оригинального программного обеспечения TEpredict (<http://tepredict.sourceforge.net/PolyCTLDesigner.html>; Antonets and Bazhan, 2013) и PolyCTLDesigner (<http://tepredict.sourceforge.net>; Antonets and Maksyutov, 2010).

### 2.6.2. Синтез генов и конструирование рекомбинантных плазмид

Синтез генов, кодирующих полиэпитопные целевые белки, был выполнен в ЗАО «Евроген» химико-ферментативным методом. Полученные продукты клонировали в вектор pBluScript. После скрининга отбирали по три клон, несущих вставку, из них выделяли плазмиды. Правильность синтезированной последовательности подтверждали после ее последующего секвенирования на автоматическом секвенаторе ABI3730x1.

Гены, кодирующие полиэпитопные иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3, были реклонированы в составе плазмидного вектора pcDNA3.1/Myс-His(+)/lacZ по сайтам гидролиза эндонуклеаз рестрикции *Hind*III и *Xho*I.

В результате было получено три рекомбинантных плазмиды p1, p2 и p3 – три прототипа ДНК-вакцины против ВИЧ-1:

- p1: pcDNA\_Kozak\_polyE(TCI-N);  
 p2: pcDNA\_Kozak\_ER-signal\_polyE\_LAMP-1(TCI-N2);  
 p3: pcDNA\_Kozak\_Ub\_polyE(TCI-N3).

### 2.6.3. Трансформация клеток *E. coli* BL21 плазмидными ДНК

Трансформацию клеточной культуры *E. coli* BL21 полученными рекомбинантными плазмидами p1, p2 и p3 проводили стандартным методом (Маниатис и др., 1984) с некоторыми модификациями.

1,5 мл клеточной культуры *E. coli*, достигшей оптической плотности  $D_{600} = 0,4-0,6$  о.е., центрифугировали 2 мин при 6000 об/мин на настольной центрифуге Eppendorf 5415D со стандартным ротором F-45-24-11. Осадок ресуспендировали в 0,7 мл CaCl<sub>2</sub>-буфера и инкубировали на льду 30 мин. Суспензию центрифугировали 2 мин при 6000 об/мин на настольной центрифуге Eppendorf 5415D с ротором F-45-24-11, осадок ресуспендировали в 0,1 мл буфера CaCl<sub>2</sub>-буфера и добавляли 3 мкл раствора, содержащего плазмидную ДНК (400 нг/мл). Смесь выдерживали во льду в течение 10 мин, затем прогревали 5 мин при 37 °С, добавляли 1 мл среды LB и выдерживали 60 мин при 37 °С. После этого 0,1 мл смеси высевали на чашках Петри диаметром 90 мм на агаризованную среду с добавлением 30 мкл ампициллина (100 мкг/мл). Чашки инкубировали в термостате при 37 °С в течение 16 ч.

### 2.6.4. Нарботка препаративного количества рекомбинантных плазмидных ДНК

1,5 мл ночной культуры трансформированных плазмидами клеток *E. coli* BL21 добавляли в 250 мл среды LB, содержащей 300 мкл ампициллина (100 мкг/мл). Инкубировали культуру при 37 °С до оптической плотности  $D_{600} = 1,0$  о.е. Затем добавляли 500 мкл ампициллина (100 мкг/мл) и растили до оптической плотности  $D_{600} = 1,5$  о.е. Для амплификации плазмид в связи с их низкой копийностью добавляли 435 мкл хлорамфеникола (100 мкг/мл) и инкубировали 4 ч. После этого клетки осаждали центрифугированием 20 мин при 8000 об/мин на настольной центрифуге Eppendorf 5415D со стандартным ротором F-45-24-11 при 4 °С.

## **2.6.5. Выделение и очистка плазмидной ДНК**

### **2.6.5.1. Лизис бактериальных клеток**

А) Клетки *E. coli* BL21, трансформированные рекомбинантной плазмидой, переносили в центрифужные флаконы на 250 мл. Постепенно добавляли охлажденный Буфер 1 (по 200 мл на 25 г клеток). Центрифугировали 15 мин при 8000 об/мин на напольной центрифуге Avanti J-26 XP (Beckman Coulter, США) с угловым ротором JA-14 при 4 °C.

Б) Супернатант удаляли, к осадку добавляли Буфер 1 в том же количестве, что и в пункте А), ресуспендировали. Ставили центрифужные флаконы в лед на 10 мин на орбитальную качалку 150 об/мин.

В) К клеткам добавляли 200 мл Буфера 2 (на 25 г клеток). Инкубировали во льду на орбитальной качалке не более 5 мин.

Г) Для нейтрализации лизата добавляли 245 мл Буфера 3 (на 25 г клеток) + 45 мл насыщенного раствора перхлората калия (постоянно перемешивать) и инкубировали во льду на орбитальной качалке 15 мин.

Д) Центрифугировали на упомянутой в А) центрифуге 25 мин при 12500 об/мин при температуре 4 °C.

Е) Супернатант фильтровали через фильтровальную бумагу.

### **2.6.5.2. Удаление РНК из раствора плазмидной ДНК**

К фильтрату добавляли раствор РНКазы А до концентрации 50 мкг/мл. Перемешивали. Инкубировали при комнатной температуре 1 ч. После этого добавляли к раствору 1/600 объема 10 % SDS, 1/1000 объема 2-меркаптоэтанола, перемешивали, добавляли 1/60 объема Буфера 3 и инкубировали во льду 30 мин. Центрифугировали на напольной центрифуге Avanti J-26 XP с угловым ротором JA-14 25 мин при 12500 об/мин при 4 °C. Супернатант фильтровали через фильтровальную бумагу.

### ***2.6.5.3. Осаждение плазмидной ДНК***

А) К фильтрату добавляли 0,7 объема изопропанола, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 10 мин.

Б) Плазмидную ДНК осаждали центрифугированием на напольной центрифуге Avanti J-26 XP с угловым ротором JA-14 при 12500 об/мин 20 мин при 4 °С.

В) Супернатант удаляли, осадок ДНК промывали 200 мл 70 % этанола, центрифугировали на напольной центрифуге Avanti J-26 XP с угловым ротором JA-14 10 мин при 12500 об/мин.

Г) Тщательно удаляли этанол и растворяли осадок в Буфере 1, равном весу исходной биомассы (1 г биомассы = 1 мл раствора ДНК).

### ***2.6.5.4. Дробное фракционирование плазмидной ДНК этиловым спиртом***

А) Раствор плазмидной ДНК переносили в стеклянные пробирки на 40 мл и добавляли 1,2 объема 96 % этилового спирта. Спирт добавляли медленно при интенсивном перемешивании. Инкубировали на льду 30 мин.

Б) Центрифугировали на напольной центрифуге Avanti J-26 XP с угловым ротором JA-20 при 15000 об/мин 20 мин при 4 °С.

В) Осадок удаляли. Добавляли к супернатанту 0,02 объема 3 М ацетата аммония и 1/7 объема 96 % этилового спирта (спирт добавляли медленно) и инкубировали во льду 15 мин.

Г) Центрифугировали при 15000 об/мин 20 мин при 4 °С.

Д) Осадок удаляли. Добавляли к супернатанту 1 объем 96 % этилового спирта (спирт добавляли медленно) и инкубировали 15 мин при -20 °С до образования осадка.

Е) Центрифугировали при 15000 об/мин 20 мин при 4 °С.

Ж) Супернатант удаляли, осадок растворяли в 3–5 мл Буфера 1 (раствор со всех пробирок).

#### ***2.6.5.5. Очистка плазмидной ДНК от примесей низкомолекулярной РНК***

А) Подготавливали иммобилизованную РНКазу: промывали 5 раз 1 М NaCl, 2 раза стерильной водой и ресуспендировали в 0,1 М NaCl.

Б) Добавляли подготовленную иммобилизованную РНКазу к раствору плазмидной ДНК: на 350 мкл (5000 ед) ДНК pcDNA-TCl брали 700 мкл геля РНКазы (10000 ед). Инкубировали 2 ч при 50 °С в термостате с перемешиванием.

В) Центрифугировали на настольной центрифуге Eppendorf 5415D со стандартным ротором F-45-24-11 при 5000 об/мин 20 мин комнатной температуре. Супернатант переносили в новые пробирки. Препараты плазмидной ДНК растворяли в бидистиллированной воде.

#### ***2.6.5.6. Измерение концентрации раствора ДНК***

Чистоту препарата ДНК, а также концентрацию определяли спектрофотометрически, путем измерения оптического поглощения при длинах волн 260–280 нм и с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле. Визуализацию ДНК проводили окрашиванием геля раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). В качестве контроля использовали наборы длин фрагментов ДНК (13 фрагментов: 0,25 kb, 0,5 kb, 0,75 kb, 1 kb, 1,5 kb, 2 kb, 2,5 kb, 3 kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb, 8 kb, 10 kb).

#### ***2.6.6. Рестрикционный анализ плазмидной ДНК***

Реакционная смесь обычно содержала 1 мкг ДНК в буфере, рекомендованном фирмой-изготовителем, и эндонуклеазу рестрикции *Bgl*III из расчета 1 ед. активности на 1 мкг ДНК. Гидролиз проводили при 37 °С в течение 180 мин. Анализ проводили с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле.

#### ***2.6.7. Трансфекция эукариотических клеток сконструированными плазмидами***

Клетки 293Т культивировали в культуральных чашках диаметром 60 мм в среде ДМЕМ, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки, 1 % L-глутамина, 100 мкг/мл линкомицина, 50 мкг/мл гентамицина, при 37 °С в присутствии

5 % CO<sub>2</sub>. При достижении 60–75 % монослоя удаляли ростовую среду и проводили трансфекцию клеток. Для трансфекции потребовалось  $9 \times 10^5$  клеток на чашку. Трансфицирующая смесь содержала 300 мкл среды ДМЕМ без сыворотки и антибиотиков, по 5 мкл плазмидной ДНК (1 мг/мл) и усилитель трансфекции – липофектамин 10 мкл (Invitrogen, США). В пробирку типа Eppendorf добавляли липофектамин к ДНК по каплям, аккуратно перемешивали и инкубировали 30 мин при комнатной температуре, затем добавляли в пробирку 0,6 мкл ДМЕМ, перемешивали. Убирали старую среду из чашки с клетками, вносили 1,2 мл ДМЕМ и по каплям добавляли 1,2 мл комплекса липофектамин–ДНК. После добавления трансфицирующей смеси к клеткам культуральные чашки помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор при 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C на 4–5 ч. После инкубации добавляли 2,6 мл среды ДМЕМ без антибиотиков с 2 % фетальной бычьей сыворотки. Через 48 ч клетки оценивали путем микроскопирования.

Плазмиду рmaxGFP использовали в качестве контроля для определения эффективности трансфекции. Уровень трансфекции составлял более 50 %. Эффективность трансфекции оценивали визуально, подсчитывая количество светящихся зеленых 293Т клеток с GFP-белком с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа «Carl Zeiss».

Через 48 ч после трансфекции снимали клетки с чашек. Для этого удаляли культуральную среду, добавляли 0,5 мл раствора трипсина-версена, пипетировали, вносили по 0,5 мл среды ДМЕМ, клеточную суспензию переносили в пробирки типа Eppendorf, центрифугировали 5 мин при 1600 об/мин на настольной центрифуге Eppendorf 5415D со стандартным ротором F-45-24-11. Надосадочную жидкость удаляли, клетки ресуспендировали в 0,5 мл PBS, подсчитывали количество клеток в образце и замораживали при -70 °C.

#### **2.6.8. Электрофорез белков в полиакриламидном геле**

Электрофоретическое разделение белков проводили в ПААГ по Лэмбли (Laemmly, 1970) в прерывистой буферной системе в присутствии 0,1 % SDS в трис-глициновом буфере. Разделяющий 10 %-ный гель содержал 3,42 мл дистиллированной воды, 2,04 мл 44 % акриламида, 152 мкл ПСА (50 мг/мл), 1,5 мл 1,5 М трис-HCl, pH 8,8, 10,6 мкл TEMED; концентрирующий 10 %-ный

гель содержал 1,34 мл дистиллированной воды, 250 мкл 30 % акриламида, 40 мкл ПСА (50 мг/мл), 416,6 мкл 0,5 М трис-HCl, pH 6,8, 5,3 мкл TEMED. К пробам добавляли литическую смесь 1:1. Перед нанесением пробы прогревались 5 мин при 95 °C. Электрофорез вели 1–1,5 ч при 150 V. Гель окрашивали 0,2 % кумасси R-250 в 10 % уксусной кислоте. Краситель отмывали кипячением в дистиллированной воде.

### 2.6.9. Вестерн-блот анализ

Разделенные электрофоретически в полиакриламидном геле белки клеточных лизатов 293Т переносили на нитроцеллюлозный фильтр 0,45 мкм по методу Товбина (Towbin and Gordon, 1984). Перенос белков из геля на фильтр осуществляли при напряжении электрического поля 150 V в течение 1 ч в буфере для переноса. Контроль переноса белков осуществляли окрашиванием полоски мембраны 0,3 % пунцовым С в течение 1 мин и отмывкой красителя дистиллированной водой до видимого исчезновения белковых полос. Участки неспецифического связывания насыщали 1 % раствором БСА в PBS-T при комнатной температуре в течение 1 ч. После этого проводили отмывку PBS-T 20 мин на качалке 150 об/мин при комнатной температуре. Сливали буфер и повторяли еще раз. Обработанные таким образом мембраны инкубировали в течение 40 мин при комнатной температуре с раствором антител 29F2 в 5 мл буфера PBS. От избытка антител избавлялись промыванием PBS-T 20 мин на качалке 150 об/мин при комнатной температуре. Сливали буфер и повторяли еще раз с использованием буфера 1xAp, pH 7,5. Далее мембраны обрабатывали антивидовыми антителами, мечеными фосфатазой в разведении 1:2500 на буфере 1xAp, pH 7,5 и инкубировали 40 мин при покачивании при комнатной температуре. Мембраны отмывали буфером 1xAp, pH 7,5 – 20 мин, затем буфером 1xAp, pH 9,2 – 20 мин. Визуализацию иммунного комплекса проводили, добавляя 5-бromo-3-индоло фосфат (BIP) и нитротетразоловый синий (NBT). Для щелочной фосфатазы: на 2 мл 1xAp, pH 9,2 смешивали BCIP 6,6 мкл и NBT 8,3 мкл и ставили в темноту до проявления. Взаимодействие антител с белками проявлялось в виде ярких сине-фиолетовых полос. Для нормализации результатов эксперимента использовали антитела к  $\beta$ -актину (anti-beta actin antibody loading



control), окрашивание клеточных лизатов проводили согласно инструкции производителя.

#### **2.6.10. Внутриклеточная детекция полиэпитопных белков TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 с использованием моноклональных антител, меченых FITC**

Клетки 293Т через 48 ч после трансфекции плазмидами снимали с культуральной чашки и расфасовывали по  $3 \times 10^5$  клеток на 1 пробирку типа Eppendorf на 2 мл с V-образным дном, отмывали 1 раз с использованием 1 мл буфера PBS, центрифугировали 5 мин при 1600 об/мин на настольной центрифуге Eppendorf 5415D со стандартным ротором F-45-24-11. Буфер удаляли и проводили фиксацию и пермеабиллизацию мембраны трансфицированных клеток с использованием набора Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. К клеткам добавляли 250 мкл буфера Cytofix/Cytoperm™ в ламинарном боксе в выключенном освещении, инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Затем отмывали с использованием 750 мкл Wash Buffer из указанного набора, центрифугировали 7 мин при 1800 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли и вносили по 1 мл Wash Buffer, центрифугировали 8 мин при 1800–2000 об/мин. Надосадочную жидкость аккуратно удаляли пипеткой, клетки ресуспендировали в 95 мкл Wash Buffer и вносили по 5 мкл раствора моноклональных антител 29F2, меченых FITC. Конъюгирование моноклональных антител 29F2 производства ЗАО «Вектор-Бэст» с флуоресцентным белком FITC было проведено Л.Р. Лебедевым. Инкубировали клетки с 29F2-FITC антителами 30 мин при 4 °С. Далее клетки промывали в 1 мл Wash Buffer и ресуспендировали в 350 мкл PBS в пробирках типа BD Falcon™ FACS tubes. После этого проводили анализ трансфицированных 293Т клеток на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur.

#### **2.6.11. Иммунизация лабораторных животных сконструированными ДНК-вакцинными конструкциями и сбор образцов для анализа**

Иммуногенность полученных ДНК-вакцинных конструкций была исследована на модели лабораторных мышей инбредной линии BALB/c, полученных из питомника лабораторных животных ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». В эксперименте использовали самок возрастом 5 – 6 недель и весом 14 – 18 г. Все животные содержались в питомнике согласно правилам лабораторной практики и получали должный уход.

В эксперименте животных были распределены на группы: по 30 мышей в группах, иммунизированных сконструированными плазмидами p1, p2, p3 и pcDNA-TCl, использованной в качестве положительного контроля. В отрицательной контрольной группе было 7 мышей, иммунизированных векторной плазмидой pcDNA3.1/Myc-His(+)/lacZ.

Иммунизацию проводили одно-, двух- или трехкратно на 0-й, 28-й и 56-й дни от начала эксперимента. С помощью инсулинового стерильного шприца вводили по 100 мкг раствора ДНК в мышцу задней конечности. После каждой иммунизации для забора образцов (на 14-й, 35-й и 72-й день от начала эксперимента) проводили эвтаназию части животных (по 10 мышей из каждой группы) методом цервикальной дислокации. В отрицательной контрольной группе после первой иммунизации проводили эвтаназию всех животных.

#### **2.6.12. Исследование ВИЧ-специфического иммунного ответа у мышей линии BALB/c после ДНК-иммунизации**

##### ***2.6.12.1. Выделение спленоцитов иммунизированных животных***

Спленоциты выделяли в стерильных условиях. Для этого протирали селезенки животных через нейлоновые клеточные сита с диаметром пор 40 мкм (BD Falcon™), используя поршень одноразового шприца на 2 мл, ресуспендировали клетки в 3 мл полной среды RPMI-1640 с 10 % FBS в пробирках с закручивающимися крышками на 15 мл (Axygen, США). Клетки центрифугировали 7 мин со скоростью 1600 об/мин при температуре 17°C на настольной центрифуге Eppendorf 5804R с бакет-ротором A-4-44. Надосадочную

жидкость удаляли, к клеточному осадку вносили по 5 мл раствора Бройля для лизиса эритроцитов и по 5 мл полной среды RPMI-1640 с 10 % FBS, ресуспендировали и инкубировали при комнатной температуре 5 мин. Далее клетки центрифугировали 7 мин со скоростью 1600 об/мин при температуре 17 °C, надосадочную жидкость удаляли, клетки промывали 2 раза с использованием 10 мл полной среды RPMI-1640. Осадок тщательно ресуспендировали в 1 мл полной среды RPMI-1640 с 10 % FBS и подсчитывали количество клеток в камере Горяева.

#### ***2.6.12.2. Стимуляция спленоцитов иммунизированных животных***

Выделенные спленоциты расфасовывали в пробирки типа Eppendorf с V-образным дном на 2 мл в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл полной среды RPMI-1640 с 10 % FBS. Стимуляцию спленоцитов, выделенных у иммунизированных животных проводили смесью синтетических пептидов ВИЧ-1, соответствующих выбранным эпитопам. Для этого использовали следующие пептиды: AMQMLKETI, IFQSSMTKI, EPFRDYVDRF, VYYDPSKDLI, SYHRLRDFI, SLYNTVATL, растворенные в 100 мкл DMSO и 900 мкл стерильной воды (2 мг/мл). Для каждого отдельного эксперимента готовили свежее разведение пептидов. Была экспериментально установлена рабочая концентрации пептидов – 10 мкг/мл каждого пептида на  $1 \times 10^6$  клеток. Инкубировали спленоциты с пептидами 18 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.

#### ***2.6.12.3. Внутриклеточное окрашивание цитокинов***

К суспензии активированных спленоцитов в стерильных условиях добавляли по 1 мкл на  $1 \times 10^6$  клеток ингибитора транспорта белков BD GolgiStop из набора Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD), и инкубировали 5 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. В качестве контролей для оценки неспецифической стимуляции использовали PMA (20 нг/мл) с Io (1 мкг/мл), а также рекомбинантный белок HBСAg (20 мкг/мл), предоставленный Л.И. Карпенко. Стимуляцию в этом случае проводили в течение 5 ч с добавлением BD GolgiStop. Кроме того, использовали контроль клеток без

добавления пептидов и контроль клеток с добавлением пептидов, но без добавления BD GolgiStop.

После инкубации клеток с ингибитором транспорта белков BD GolgiStop клетки центрифугировали на настольной центрифуге Eppendorf 5415D со стандартным ротором F-45-24-11 5 мин со скоростью 1600 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, клетки промывали в 1 мл PBS, 5 мин 1600 об/мин. Буфер удаляли и проводили фиксацию и пермеабиллизацию мембраны клеток с использованием набора Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. К клеткам добавляли 250 мкл буфера Cytofix/Cytoperm™ в ламинарном боксе с выключенным освещением, инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Затем отмывали с использованием 750 мкл Wash Buffer из указанного набора, центрифугировали 7 мин при 1800 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли и вносили по 1 мл Wash Buffer, центрифугировали 8 мин при 1800–2000 об/мин. Надосадочную жидкость аккуратно удаляли пипеткой, клетки ресуспендировали в 80 мкл Wash Buffer и проводили окрашивание следующими моноклональными антителами: PerCP Rat Anti-Mouse CD4 (2 мкл/1 млн клеток), FITC Rat Anti-Mouse CD8a (2 мкл/1 млн клеток), PE Hamster Anti-Mouse CD3ε (1 мкл/1 млн клеток), APC Rat Anti-Mouse IFNγ (3 мкл/1 млн клеток), APC Rat Anti-Mouse IL-2 (3 мкл/1 млн клеток). Все концентрации антител были подобраны экспериментально. Инкубировали клетки с моноклональными антителами 30 мин при 4 °C. Далее клетки промывали в 1 мл Wash Buffer и ресуспендировали в 350 мкл PBS в пробирках типа BD Falcon™ FACS tubes. После этого проводили анализ клеток на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur.

#### **2.6.13. Определение количества ВИЧ-1 Env- и Gag-специфических CD8+ Т-лимфоцитов у вакцинированных добровольцев с использованием пептид-МНС-пентамеров**

Перед постановкой исследования предварительно проводили HLA-типирование образцов крови иммунизированных вакциной добровольцев при помощи метода ПЦР, поскольку используемые в исследовании коммерческие МНС-тетрамерные комплексы являются специфичными к аллелю HLA A\*0201.

HLA-типирование проводилось в Клинике Лимфологии, НИИ Клинической и Экспериментальной Лимфологии СО РАМН, г. Новосибирск.

Непосредственно для определения ВИЧ-специфических CD8+ Т-лимфоцитов нам были предоставлены аликвоты суспензии периферических мононуклеарных клеток крови (PBMC), полученных от вакцинированных HLA A\*0201-позитивных добровольцев в контрольных точках согласно протоколу клинических испытаний.

Суспензию PBMC каждого образца доводили до концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/1 мл буферным раствором PBS с 2 % FBS, центрифугировали 5 мин при 1600 об/мин на настольной центрифуге Eppendorf 5415D со стандартным ротором F-45-24-11. Надосадочную жидкость удаляли и ресуспендировали клетки 90 мкл буферного раствора PBS с 2 % FBS. Проводили окрашивание PBMC моноклональными анти-CD8 антителами, мечеными FITC (ProImmune, Великобритания) – по 1 мкл на  $1 \times 10^6$  клеток и МНС-пентамерами (ProImmune, Великобритания): по 5 мкл на  $1 \times 10^6$  клеток Env D1 (KLTPLCVTL aa 120-128) и по 5 мкл на  $1 \times 10^6$  клеток Gag 17A (SLYNTVATL aa 77-85). После 40 мин инкубации при комнатной температуре однократно отмывали окрашенные клетки PBS с 2 % FBS и ресуспендировали в 500 мкл PBS. Анализ образцов осуществляли на проточном цитофлуориметре BD FACSAria с использованием предложенного производителем программного обеспечения.

В созданном эксперименте строили точечный график с координатами по параметрам прямого светорассеивания FSC и бокового светорассеивания – SSC. В процессе сбора данных применяли «живой гейт» на лимфоцитах и собирали не менее  $2 \times 10^5$  клеток. Для анализа данных строили точечный график с координатами по параметрам интенсивности флуоресценции CD8-FITC и прямого светорассеивания – CD8-FITC vs FSC. На полученном графике выделяли гейт CD8+ Т-лимфоцитов. Количество пентамер-специфических CD8+ Т-лимфоцитов оценивали на точечном графике CD8-FITC vs исследуемый пентамер-PE. Определяли процент пентамер-специфических CD8+ Т-лимфоцитов относительно общей популяции CD8+ Т-клеток отдельно для тетрамера Env D1 (KLTPLCVTL) и Gag 17A (SLYNTVATL). В качестве контролей использовали лимфоциты вакцинированных добровольцев, имеющих

HLA-аллель I класса с гаплотипом, отличным от HLA A\*0201 согласно результатам HLA-генотипирования.

#### **2.6.14. Статистическая обработка полученных результатов**

Статистический анализ данных выполнен совместно с канд. биол. наук Антоном Д.В. в среде статистических вычислений R (R Core Team, 2014) с использованием критерия Манна-Уитни. При множественном тестировании коррекция значений P проводилась с помощью метода Бенджамини-Хохберга (процедуры FDR – false discovery rate) (Benjamini *et al.*, 1995). Различия между двумя группами считались достоверными, когда установленное значение P (или модифицированное значение P при множественном тестировании) было  $\leq 0,05$ .

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование протективного иммунного ответа, который мог бы защитить от широкого разнообразия циркулирующих вариантов ВИЧ-1, является сложной задачей (Hanke and McMichael, 2011). Создание Т-клеточной вакцины направлено на формирование CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам ВИЧ-1 (Koup and Douek, 2011; Barouch *et al.*, 2012; Esparza, 2012). Известно, что CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты являются эффективными медиаторами противовирусного иммунного ответа, так как способны супрессировать вирусную репликацию и принимать участие в элиминации инфицированных клеток (Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994; Jin *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 1999; Saez-Cirion *et al.*, 2007). Недавно было показано, что стимулированный вакцинацией ВИЧ-специфический CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ способен контролировать репликацию ВИЧ-1 на модели животных (Mudd *et al.*, 2012).

Стратегия проектирования искусственных полиэпитопных иммуногенов считается перспективной для создания Т-клеточных вакцин (Kulkarni *et al.*, 2013; Hanke, 2014; Karpenko *et al.*, 2014). Ранее коллективом ученых из ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» был создан полиэпитопный иммуноген TCI – компонент кандидатной вакцины против ВИЧ-1 «КомбиВИЧвак» (Bazhan *et al.*, 2004). TCI включает фрагменты последовательностей белков ВИЧ-1, которые содержат более 80 перекрывающихся CD8<sup>+</sup> ЦТЛ и CD4<sup>+</sup> Т-хелперных эпитопов, способных индуцировать ВИЧ-1-специфические Т-клеточные ответы (Karpenko *et al.*, 2004). Однако при проектировании иммуногена TCI не проводилась оптимизация его структуры с учетом расположения эпитопов, мотивов для связывания с белками ТАР, сайтов процессинга, а также не использовались сигнальные последовательности для нацеливания иммуногена для его презентации по пути МНС I и МНС II классов.

В тоже время в последние годы появились новые данные, свидетельствующие о том, что иммуногенность искусственных вакцинных конструкций, индуцирующих Т-клеточный ответ, можно повысить путем оптимизации их структуры. Прогресс в идентификации CD8<sup>+</sup> Т-клеточных эпитопов и понимании механизмов процессинга и презентации антигенов по пути МНС I и МНС II класса обеспечил основу для рационального дизайна новых

оптимизированных полиэпитопных ВИЧ-1 Т-клеточных иммуногенов. В теоретическом отделе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» в рамках реализации мероприятий, предусмотренных распоряжением Правительства России от 25.12.2007 г. № 1905-р, был проведен дизайн нескольких вариантов новых полиэпитопных ВИЧ-1 иммуногенов: TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3. Указанные иммуногены были разработаны с учетом последних данных литературы по оптимизации экспрессии, процессинга и представления иммунной системе CD4+ и CD8+ Т-клеточных эпитопов.

В задачу данной работы входило исследование влияния оптимизации структуры иммуногенов и дополнительных сигнальных последовательностей, обеспечивающих представление антигенов по пути МНС I и МНС II рестрикции, на величину индуцируемого ВИЧ-специфического CD4+ и CD8+ Т-клеточного ответа, а также выявление наиболее перспективной стратегии проектирования полиэпитопных Т-клеточных ВИЧ-1-иммуногенов.



### **3.1. Проектирование искусственных ВИЧ-1 полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3**

#### **3.1.1. Выбор Т-клеточных эпитопов**

Дизайн аминокислотной последовательности полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов TCI-N (polyE), TCI-N2 (ER-signal\_polyE\_LAMP-1) и TCI-N3 (Ub\_polyE) был выполнен в теоретическом отделе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Антоном Д.В. под руководством Бажана С.И.

На первом этапе проектирования «коровой» последовательности целевых иммуногенов необходимо было решить, из каких белков ВИЧ-1 необходимо выбрать эпитопы для формирования протективного иммунитета (Saunders *et al.*, 2012). Вирус иммунодефицита человека 1 типа содержит гены девяти белков, три из которых являются структурными (Gag, Pol, Env), и шесть – неструктурных белков (Nef, Tat, Rev, Vpr, Vpu, Vif). Для выбора белков – «доноров» эпитопов с целью включения в состав полиэпитопной Т-клеточной вакцины могут быть применены различные критерии: консервативность последовательности, уровень продукции вирусного белка и время продукции в жизненном цикле вируса (Koup and Douek, 2011). Полимеразный полипротеин (включая протеазу, обратную транскриптазу и интегразу) определенно наиболее консервативный среди штаммов ВИЧ-1 и поэтому является перспективным «донором» эпитопов для включения в состав вакцины (Yusim *et al.*, 2007). С точки зрения уровня распознавания иммунной системой, Gag и Env являются доминирующими (Koup and Douek, 2011). При этом Gag является высоко консервативным среди штаммов ВИЧ-1, а Env представляет собой чередование высоко консервативных и высоко вариабельных областей, последние являются в основном результатом «иммунного давления» со стороны антител. Кроме того, оба являются структурными белками, поэтому нарабатываются на высоких уровнях и в одно и то же время в течение жизненного цикла вируса (Koup and Douek, 2011). Остальные белки ВИЧ-1 являются либо регуляторными (Nef, Tat, Rev), либо вспомогательными (Vpr, Vpu, Vif), поэтому присутствуют в более низких уровнях, чем структурные белки. Учитывая, однако, их раннюю и конститутивную продукцию в жизненном цикле ВИЧ-1, они также могут быть

кандидатами для включения в различные виды Т-клеточных вакцин (Koup and Douek, 2011). Кроме того, некоторые исследователи оценивали Т-клеточный ответ в течение ВИЧ-инфекции и показали, что существует определенная иерархия в распознавании CD8+ Т-лимфоцитами белков ВИЧ-1. Наиболее узнаваемыми оказались эпитопы Gag, Pol и Env, а далее согласно выявленной иерархии следуют эпитопы Nef и Tat (Betts *et al.*, 2001; Koup and Douek, 2011). Кроме того, было показано, что ответы CD8+ Т-лимфоцитов на Gag наиболее сильно связаны с антивирусным контролем при хронической ВИЧ-инфекции (Zuniga *et al.*, 2006; Rolland *et al.*, 2008), а также Gag-специфические ответы на вирус ВИЧ-1 наиболее прочно ассоциируются с контролем репликации вируса у ВИЧ-нонпрогрессоров (люди, у которых обнаружены антитела к ВИЧ, но которые на протяжении 15 – 20 лет не проявляют признаков болезни и поддерживают уровень CD4+ Т-клеток в пределах нормы) (Riviere *et al.*, 1995; Liang *et al.*, 2005; Kiepiela *et al.*, 2007; Sacha *et al.*, 2007; Kawada *et al.*, 2008; Saez-Cirion *et al.*, 2009; Julg *et al.*, 2010).

На сегодняшний день сложилось мнение, что эффективная вакцина должна вызывать Т-клеточный иммунный ответ на консервативные эпитопы ВИЧ-1, рестриктированные наиболее распространенными молекулами HLA I класса (Korber *et al.*, 2009), поскольку консервативные вирусные антигены могут сыграть решающую роль для защиты от значительного многообразия антигенных вариантов ВИЧ-1 (Wilson *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007; Korber *et al.*, 2009; Hanke, 2014). Известно, что оптимально отобранные эпитопы ВИЧ-1, рестриктированные пятью различными аллелями HLA I класса, охватывают 80–90 % населения и девять пептидов требуется, чтобы охватить практически всю популяцию (Lalvani *et al.*, 1994; Sidney *et al.*, 1996; Sette and Sidney, 1998). Кроме того, считается, что оптимальные CD8+ Т-клеточные вакцины должны стимулировать ответы ЦТЛ против множественных антигенных детерминант ВИЧ-1 (Hanke, 2014). Наряду с этим показано, что аффинность или кросс-реактивность эпитопов с молекулами МНС положительно коррелирует с иммуногенностью вакцины (Berzofsky *et al.*, 2001).

Таким образом, основываясь на существующих знаниях, для дизайна целевых иммуногенов были выбраны консервативные Т-клеточные эпитопы в

последовательностях белков ВИЧ-1 Env, Gag, Pol, Nef и Tat. Выбор эпитопов проводился из списка экспериментально верифицированных CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клеточных эпитопов, представленных в HIV molecular immunology database ([http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/optimal\\_ctl\\_summary.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/optimal_ctl_summary.html)), с консерватизмом не ниже 80 % по крайней мере, в одном из субтипов А, В или С.

На следующем этапе среди выбранных консервативных эпитопов были предсказаны пептиды, имеющие высокий или средний аффинитет к молекулам HLA и обладающие дополнительной HLA-специфичностью. Связывание пептидов с молекулами HLA предсказывалось с использованием программы TEpredict (Antonets and Maksyutov, 2010; <http://tepredict.sourceforge.net>). Для дизайна полиэпитопной конструкции выбирались пептиды, для которых предсказанное значение  $pIC_{50}$  (концентрация полумаксимального ингибирования) было больше либо равно 6.3 ( $IC_{50} \sim 500$  нМ).

Дальнейший выбор эпитопов проводился с использованием программы PolyCTLDesigner, интегрированной с программой TEpredict (Antonets and Bazhan, 2013; <http://tepredict.sourceforge.net/PolyCTLDesigner.html>).

PolyCTLDesigner позволяет выбрать минимальный набор эпитопов с известной или предсказанной специфичностью к разным аллельным вариантам молекул МНС I класса, охватывающий выбранный репертуар аллелей HLA с заданным уровнем избыточности.

В результате с использованием этой программы для проектирования последовательности целевых иммуногенов было выбрано 50 CD8<sup>+</sup> Т-клеточных эпитопов, покрывающих разнообразие наиболее широко представленных 35 аллельных вариантов HLA с пятикратной избыточностью (табл. 2).

Таблица 2

CD8+ Т-клеточные эпитопы белков Env, Gag Pol, Nef и Tat, выбранные для дизайна целевых Т-клеточных иммуногенов

Идентификаторы имен эпитопов, IDs	Эпитопы	A*0101	A*0202	A*0203	A*0206	A*0301	A*1101	A*2301	A*2402	A*2403	A*2601	A*2902	A*3001	A*3002	A*3101	A*6801	A*6802	A*6901	B*0702	B*0801	B*1501	B*1801	B*2705	B*3501	B*4001	B*4002	B*4402	B*4403	B*4501	B*5101	B*5301	B*5401	B*5701	B*5801	
16484_POL_0.99_0.95_0.98_1	GKLNWASQI										6.87											7.79					6.85	7.31							
2435_GAG_0.87_0.89_0.84_1	FSPEVIPMF										8.88			7.32									6.84												
4776_GAG_0.98_0.98_0.97_1	GLNKIVRMY											7.44		7.39							6.82														
38481_POL_0.95_0.93_0.94_1	KTAVQMAVF										7.04			7.47												7.05									6.84
32421_GAG_0.84_0.86_0.90_1	KRWIILGLN					8.17	6.81						6.87	7.56								7.40											7.54		
34944_POL_0.99_0.95_0.98_1	LVGKLNWAS	6.81					7.65																	7.70											
43418_ENV_0.70_0.89_0.56_1	VYGVVPVWK						7.66						7.24		7.07	7.88										6.89									
9209_POL_0.92_0.91_0.92_1	ETFYVDGAA										7.23			6.93		7.62	7.32	7.64				7.10		7.20									8.71	7.13	
134586_ENV_0.82_0.75_0.81_1	FCASDAKAY											7.70		7.73										8.00											
13905_GAG_0.96_0.23_0.96_1	VRMYSVPSI																					7.60					7.02	6.95	7.15						
43968_GAG_0.09_0.88_0.85_1	TPQDLNTML										7.53			6.84					6.95							7.36									
36952_POL_0.93_0.92_0.92_1	IVTDSQYAL		7.97								6.88			6.89				6.85						7.82		8.16									
2181_GAG_0.86_0.81_0.04_1	EVIPMFSAL		7.12	7.24	7.61				7.57		7.19						7.41	7.33				6.91		7.78		7.31									
32589_POL_0.97_0.90_0.94_1	AVFIHNFKR						8.48						7.15		7.98	7.34																			
94381_ENV_0.88_0.83_0.82_1	LFCASDAKA		6.85																					7.01									6.99		6.91
8741_POL_0.96_0.95_0.98_1	TVLDVGDAY										8.39	7.26		7.59		6.91						6.83	7.28		7.10		6.87							6.87	
734_POL_0.96_0.92_0.92_1	TPVNIIGRN						6.93																									7.23	6.83		
4062_GAG_0.93_0.92_0.95_1	SPRTLNAWV													7.20					7.33							7.55								6.84	
4201_POL_0.95_0.92_0.97_1	TDSQYALGI																	7.71				7.32				7.99	7.06	7.38	7.40		6.92				
17520_POL_0.37_0.90_0.95_1	VIYQYMDDL		7.20						7.07	8.35	7.08																6.92								6.99
616_VIF_0.08_0.82_0.01_1	WHLGQGVSI				7.39			6.93														7.88			7.36	9.14	6.88				7.75				
25479_GAG_0.01_0.69_0.82_1	VQNLQGQMV																												6.87				8.04		
17755_POL_1.00_0.98_0.98_1	KLVDFRELN					6.85							6.89	7.10																					
2359_POL_0.84_0.70_0.17_1	ETKLGKAGY										7.07			7.35																					
34965_POL_0.77_0.91_0.86_1	KIQNFRVYY											8.91	7.11		7.30											7.89								6.84	
38635_POL_0.73_0.84_0.95_1	ITLWQRPLV										7.54														6.96		8.15			7.04			8.97		

[illegible]

**PD** – В выборке консервативных эпитопов имена пептидов записаны в виде 16484\_POL\_0.99\_0.95\_0.98\_1, где разделенные позиции означают: Номер пептида\_Белок\_Консервативность в субтипе А\_ Консервативность в субтипе В\_ Консервативность в субтипе С\_начало эпитопа

Эффективность взаимодействия (аффинитет) эпитопов (пептидов) с молекулами МНС представлена значениями  $IC_{50}$ :

$pIC_{50} \geq 7,3$  – высоко аффинные пептиды;

6,3 ≤ pIC<sub>50</sub> < 7,3 – умеренно аффинные пептиды;

$pIC_{50} < 6,3$  – низко аффинные пептиды.

### 3.1.2. Дизайн последовательности целевых Т-клеточных иммуногенов

Общая стратегия проектирования целевых иммуногенов TCI-N (polyE), TCI-N2 (ER-signal\_polyE\_LAMP-1) и TCI-N3 (Ub\_polyE) представлена на рисунке 5. В основе всех трех полиэпитопных иммуногенов лежит «коровая» последовательность **polyE** (от англ. *Polyepitope*), а отличия между иммуногенами заключаются лишь в использовании разных концевых сигнальных последовательностей. При этом последовательность polyE состоит из двух фрагментов, один из которых (**polyCTL**) содержит CD8+ ЦТЛ-эпитопы, а другой (**polyTh**) – CD4+ Т-хелперные эпитопы, которые, как известно, усиливают ответы CD8+ ЦТЛ.

Дизайн последовательности polyCTL-фрагмента проводили с использованием программного обеспечения PolyCTLDesigner (Antonets and Bazhan, 2013). Чтобы обеспечить протеасомное высвобождение эпитопов и оптимизировать связывание образующихся пептидов TAP, PolyCTLDesigner для каждой пары эпитопов выбирает наиболее совершенную спейсерную последовательность, оптимизирует взаимное расположение эпитопов в составе полиэпитопной конструкции, а также минимизирует количество нецелевых эпитопов, которые могут образовываться на стыке целевых эпитопов. Для предсказания аффинности связывания эпитопов с TAP PolyCTLDesigner использует модели, разработанные Петерсом и коллегами (Peters *et al.*, 2003), для предсказания протеасомного/иммунопротеасомного расщепления – модели, разработанные Тоузом и коллегами (Toes *et al.*, 2001).

Для дизайна последовательности polyTh-фрагмента были использованы высококонсервативные HLA-DR связывающие Т-хелперные пептиды (KTAVQMAVFIHNFKR, KRWILGLNKIVRMY, SPAIFQSSMTKILEP, WEFVNTPLVLKLWYQ, HSNWRAMASDFNLPP, QKQITKIQNFRVYYR), для которых в случае ВИЧ-1 субтипа А была предсказана консервативность не менее 40 %. Кроме того, в состав polyTh-фрагмента был включён универсальный Т-хелперный пептид ‘PADRE’ (**pan HLA DR-binding epitope** – AKFVAAWTLKAAA), который вызывает ответы CD4+ Т-хелперов в ассоциации с множественными HLA-DR-алломорфами, а также с мышиными молекулами I-A<sup>b</sup>. Объединение Т-хелперных эпитопов в составе полиэпитопной конструкции

осуществляли с помощью мотивов R/K–R/K, являющихся сайтами расщепления для лизосомных катепсинов В и L.

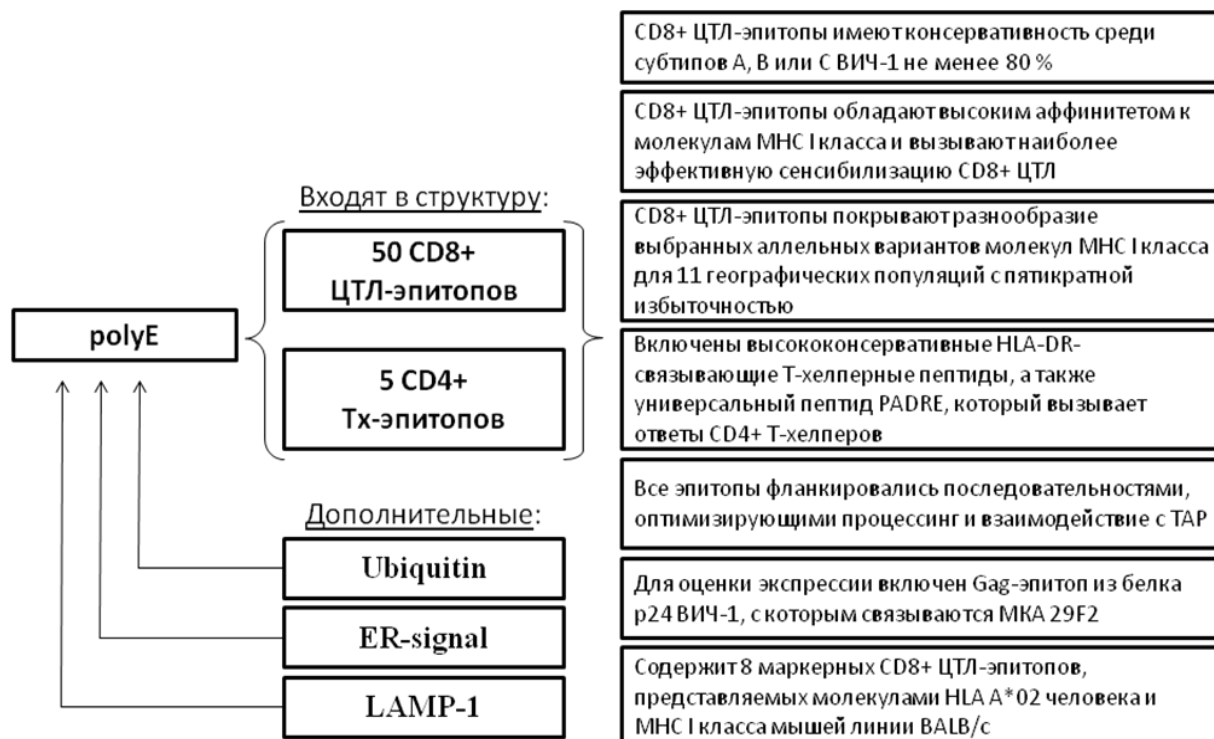


Рисунок 5. Общая стратегия проектирования целевых Т-клеточных иммуногенов

Для оценки экспрессии и метаболической стабильности полиэпитопных иммуногенов к последовательности polyE был добавлен EPFRDYVDRLFYKTLR Gag-эпитоп из белка р24 ВИЧ-1, с которым специфически связываются коммерчески доступные моноклональные антитела (МКА) 29F2.

В итоговую последовательность polyE кроме эпитопов, указанных в таблице 2, были включены восемь дополнительных маркерных пептидов, представляемых в комплексе с молекулами МНС I класса как человека (HLA A\*02), так и мышей инбредной линии BALB/c (H-2<sup>d</sup>). Это было сделано для возможности исследования иммуногенности полученных конструкций на модели мышей, что позволило бы дискриминировать эффект убиквитин (Ub)- и LAMP-1-зависимого процессинга целевого иммуногена, механизмы которого не отличаются у человека и мыши (Hershko and Ciechanover, 1998; Voges *et al.*, 1999; Dennes *et al.*, 2002; Haucke, 2003; Song *et al.*, 2006).

Таким образом, результирующая полиэпитопная конструкция polyE имеет следующий вид (рис. 6):

VYYDPSKDLI-ADL-SYHRLRDFI-ADG-TPLCVLSLF-AIAV-KLTPLCVTL-AMQMLKETIAD-SLYNTVATL-ALYNTVATLQ-RDLS-IFQSSMTKI-ADL-IYQEPFKNL-AD-YVDRFFKTL-R-GLNKIVRMY-ADLA-GKKAIGTVL-A-RPQVPLRPM-ADGV-GKLNWASQI-ADL-KTAVQMAVF-ADG-SPRTLNAWV-AD-ETKLGKAGY-AD-ETPGIRYQY-ADGAA-ETINEEAAE-AI-GYVDRFYKTL-A-FCASDAKAY-A-TPQDLNTML-RIA-TINEEAAEW-ADA-TPVNIIGRN-ADGV-KLVDFRELN-AD-EVIPMFSAI-A-LVGKLNWAS-ADA-SEGATPQDL-KGLGISYGR-ADL-MREPRGSDI-ADGS-TDSQYALGI-AD-GHQAAMQML-AVFIHNFKR-ADGV-VQNLQGMV-ADGA-VTDSQYALG-ADGS-IRLRPGGKK-ADG-ITLWQRPV-ADLV-IVTDSQYAL-A-DYVDRFFKT-ADAV-KLNWASQIY-ADL-TVLDVGDAY-ADG-KIQNFRVYY-ADGA-ETFYVDGAA-ADG-WHLGQGVSI-AI-LFCASDAKA-AD-RDYVDRFFK-ADL-AFSPEVIPM-ADGS-KRWIILGLN-ADLA-FSPEVIPMF-ADL-TVYGVVPVW-ADGS-RQANFLGKI-ADL-CRAPRKKGC-ADG-VRMYSFVSI-A-DRFYKTLRA-AD-LVIYQYMDL-AD-VYGVVPVWK-ADG-WASRELERF-ADGV-RDYVDRFYK-ADLKK-AKFVAAWTLKAAA-K-KTAVQMAVFVFIHNFKR-KRWIILGLNKIVRMY-KK-SPAIFQSSMTKILEP-KK-WFVNTPLVLKWLWYQ-KK-HSNWRAMASDFNLPP-K-KQKQITKIQNFRVYYR-K-epfrdyvdrfyktrlr

Рисунок 6. Дизайн «коровой» последовательности polyE. Маркерные CD8+ ЦТЛ-эпитопы, представляемые молекулами HLA A\*02 человека и MHC I класса мышей линии BALB/c (H-2<sup>d</sup>) отмечены нижним подчеркиванием; CD8+ ЦТЛ-эпитопы, представляемые молекулами MHC I класса человека, выделены жирным шрифтом; CD4+ Т-хелперные эпитопы выделены курсивом; маркерный Gag-эпитоп из белка p24 ВИЧ-1 обозначен строчными буквами

### 3.1.3. Проектирование целевых Т-клеточных иммуногенов

Для того чтобы обеспечить эффективный процессинг и представление как CD8+ ЦТЛ, так и CD4+ Т-хелперных эпитопов, в состав спроектированных иммуногенов были включены дополнительные последовательности, в том числе:

- N-концевой убиквитин (Ub):

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGV<sub>76</sub>;

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

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 MHC I и MHC II классов (рис. 7):



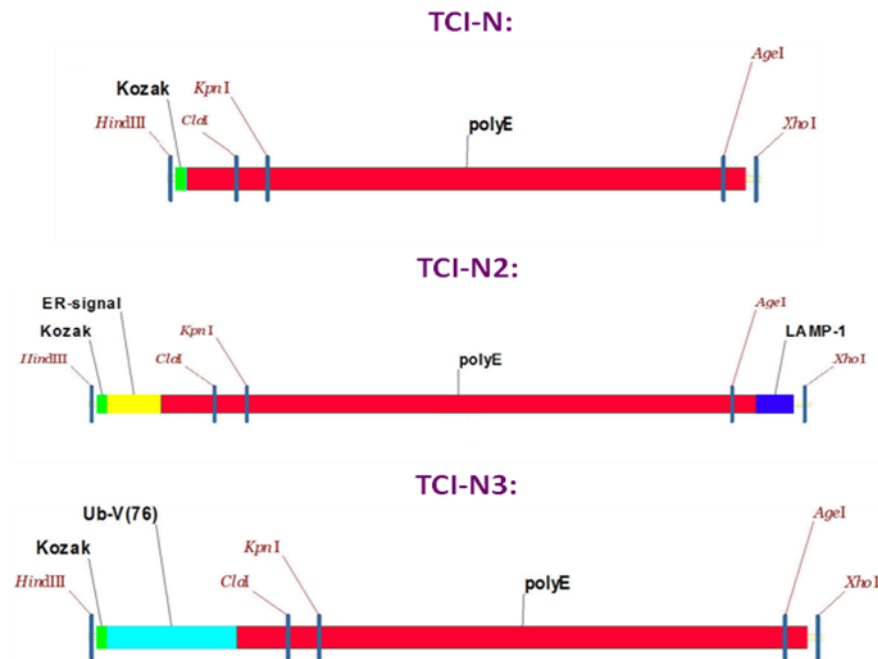


Рисунок 7. Структуры спроектированных полиэпитопных иммуногенов TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 на основе «коровой» последовательности polyE

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

Поскольку «коровая» последовательность polyE содержит как CD8+, так и CD4+ Т-клеточные эпитопы, то две другие конструкции были спроектированы с учетом того, чтобы повысить потенциал ДНК-вакцины путем нацеливания polyE либо на лизосому для усиления ответа Т-хелперов, либо на протеасому для усиления ответа ЦТЛ.

В частности, 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 презентуются на поверхности АПК CD4+ Т-клетам.

Так как цитоплазматическая деградация синтезируемых в клетке вирусных белков чаще всего проходит по убиквитин-зависимому пути с участием

протеасом, то один из обещающих подходов для усиления ответов CD8+ ЦТЛ включает специфический таргетинг вакцинных антигенов (путем присоединения убиквитина) в протеасому для их процессинга и презентации по пути МНС I класса. Образующиеся при этом пептиды транспортируются TAP1/TAP2 гетеродимерами в эндоплазматический ретикулум, где они связываются с молекулами МНС I класса и  $\beta$ -микроглобулином (Tobery and Siliciano, 1997). Именно поэтому для усиления ответа CD8+ Т-лимфоцитов была предложена конструкция TCI-N3 (Ub\_polyE), содержащая N-концевой убиквитин (Grant *et al.*, 1995).

#### **3.1.4. 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. Гуманизированные кодоны пригодны также для оптимальной экспрессии целевых генов в мышинных клетках, так как частота синонимичных кодонов для человека и мыши практически совпадают, что позволит проводить иммунологические эксперименты на мышинной модели.

На 5'-конце перед иницирующим кодоном ATG добавлена последовательность Kozak (CCGCCACC). В конце кодирующих последовательностей размещены три стоп-кодона (TAGTGATGA).

Последовательности искусственных генов TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 имеют длину 2451, 2532 и 2679 п. н. соответственно.

Конструирование рекомбинантных плазмид было выполнено совместно с Максютковым Р.А.

Для обеспечения экспрессии в эукариотических клетках гены, кодирующие полиэпитопные иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3, были вырезаны из вектора pBluscript и клонировали в составе плазмидного экспрессионного вектора pcDNA3.1/Мyc-His(+)/lacZ (далее pcDNA3.1) по сайтам рестрикции *Hind*III и *Xho*I.

Все три целевых гена были клонированы по аналогичной схеме (рис. 8).

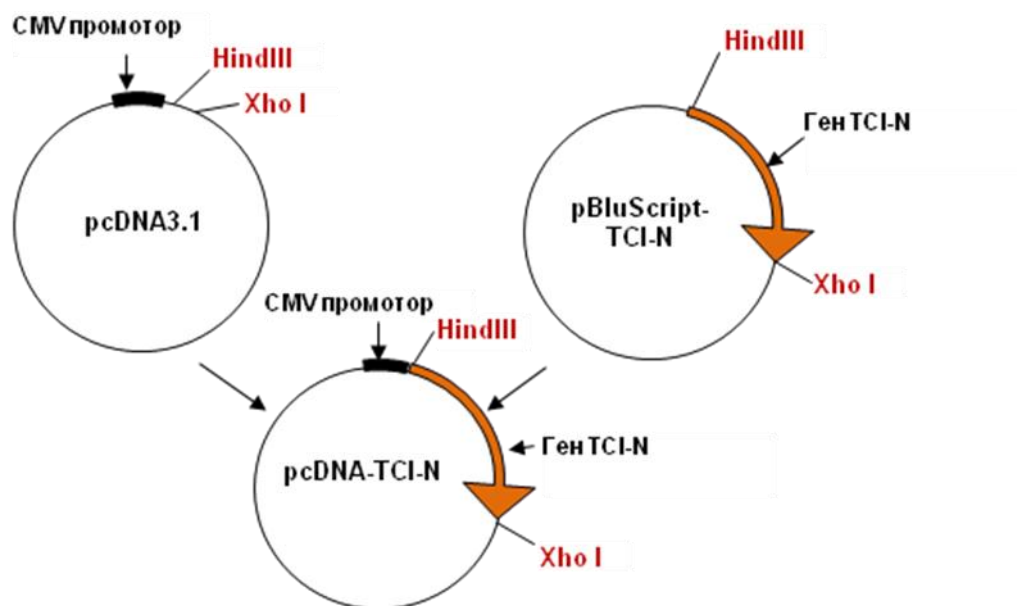


Рисунок 8. Клонирование гена, кодирующего полиэпитопный белок TCI-N в составе плазмидного экспрессионного вектора pcDNA3.1

Фрагменты ДНК, содержащие целевые гены, получали путем гидролиза эндонуклеазами рестрикции *Hind*III и *Xho*I плазмид pBluscript-TCI-N, pBluscript-TCI-N2 и pBluscript-TCI-N3. Далее 0,5 мкг фрагментов полученных генов лигировали в стандартных условиях с 0,1 мкг плазмиды pcDNA3.1, гидролизованной эндонуклеазами рестрикции *Xho*I и *Hind*III. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* DH5F', из клонов, выросших на среде с ампициллином, выделяли плазмидную ДНК и подвергали рестрикционному анализу с помощью эндонуклеаз рестрикции *Hind*III, *Xho*I и *Bgl*II. В результате было получено три рекомбинантных плазмиды p1, p2 и p3 – три кандидатные ДНК-вакцины против ВИЧ-1:

- p1: pcDNA\_Kozak\_polyE(TCI-N),
- p2: pcDNA\_Kozak\_ER-signal\_polyE\_LAMP-1(TCI-N2),
- p3: pcDNA\_Kozak\_Ub\_polyE(TCI-N3),

Сконструированные рекомбинантные плазмиды p1, p2 и p3 имеют размер 7878, 7959, 8106 п.н. соответственно. В составе этих плазмид целевые гены, кодирующие полиэпитопные белки TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3, находится под контролем цитомегаловирусного (CMV) промотора, обеспечивающего его экспрессию в клетках млекопитающих.

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

Показано, что нуклеотидные последовательности генов в образцах совпадают с теоретически рассчитанными последовательностями.

### **3.1.5. Нарботка препаративного количества ДНК рекомбинантных плазмид**

Клетки *E. coli* BL21 были трансформированы плазмидами p1, p2 и p3, кодирующими полиэпитопные белки TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3. Этот штамм был выбран эмпирическим путем и обеспечивал наибольший выход плазмидной ДНК. Нарращивание биомассы клеточной культуры *E. coli* BL21 для препаративного выделения рекомбинантных плазмидных ДНК проводили по стандартной схеме (Маниатис и др., 1984). Препаративные количества рекомбинантных плазмидных ДНК, используемых в дальнейшем для трансфекции эукариотических клеток и иммунизации лабораторных животных, получали с помощью методики, описанной в главе 2. Чистоту препарата ДНК определяли спектрофотометрически, путем измерения оптического поглощения при длинах волн 260–280 нм, с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле и определения эндотоксина с использованием ЛАЛ-реагента (Endosafe-PTS, США) согласно инструкции производителя. Плазмидную ДНК растворяли в бидистиллированной воде.

### **3.2. Изучение экспрессии целевых генов в клетках 293Т, трансфицированных рекомбинантными плазмидами**

Для оценки экспрессии целевых генов проводили трансфекцию клеток 293Т рекомбинантными плазмидами p1, p2 и p3 с использованием липофектамина (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Трансфекцию плазмидой рmaxGFP использовали в качестве контроля для определения эффективности трансфекции. Эффективность трансфекции клеток 293Т оценивали визуально с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа «Carl Zeiss», когда количество флуоресцирующих клеток в монослое после трансфекции рmaxGFP достигало 50 – 70 %. Клетки выращивали в среде ДМЕМ без антибиотиков с 2 % содержанием FBS.

Через 48 ч после трансфекции исследовали продукцию полиэпитопных белков TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 с помощью вестерн-блот анализа и внутриклеточного окрашивания целевых полиэпитопных белков МКА 29F2, мечеными флуорохромом FITC, с последующей детекцией сигнала на проточном цитометре.

### 3.2.1. SDS-PAGE и вестерн-блот анализ

Вестерн-блот анализ проводили с использованием лизатов клеток 293Т, трансфицированных рекомбинантными плазмидами p1, p2 и p3, кодирующими полиэпитопные иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3. Клеточные белки разделяли в полиакриламидном геле с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Выявление специфических целевых белков TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 осуществляли с помощью МКА 29F2 к Gag эпитопу-маркеру, включенному в состав всех исследуемых белков. Было показано, что на дорожках, соответствующих трансфицированным плазмидами клеткам, детектируются специфичные фрагменты белков, что подтверждает их синтез в клетке, направляемый целевыми ДНК-вакцинными конструкциями (рис. 9А).

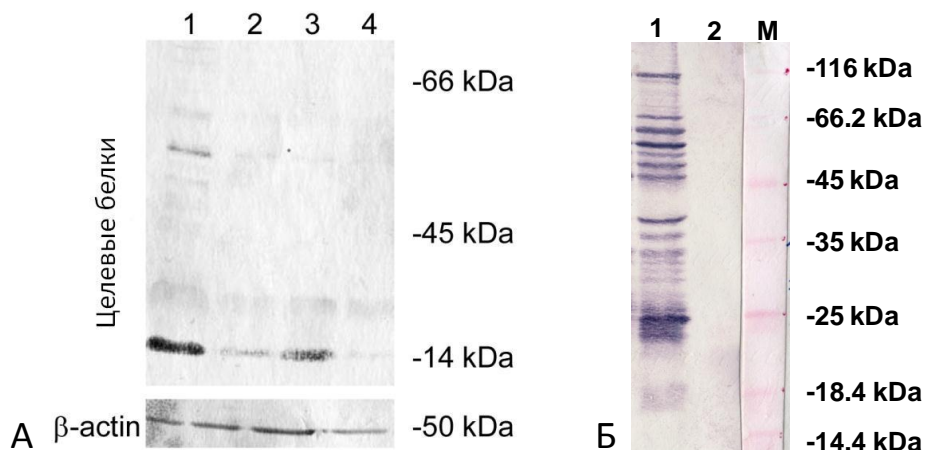


Рисунок 9. Вестерн-блот анализ продуктов экспрессии генов, кодирующих полиэпитопные белки TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3. А) Дорожки 1, 2, 3 содержат лизаты клеток 293Т, трансфицированных плазмидами p1, p2 и p3; 4 – отрицательный контрольный образец, представляющий лизат клеток 293Т, трансфицированных исходным вектором pcDNA3.1.; стрелками указан молекулярный вес белков; снизу представлен контроль количества клеток с использованием антител к  $\beta$ -актину. Б) Дорожка 1 содержит лизат клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой pGEX-4T-TCI-N; Дорожка 2 содержит лизат клеток *E. coli* без трансформации; М – маркер молекулярной массы белков

По расчетным данным, молекулярная масса полноразмерных белков должна составлять около 90 кДа. Результаты показывают, что с использованием МКА 29F2 специфически детектируются белки в низкомолекулярной области (14 кДа) (рис. 9А). Полученные данные являются закономерными, поскольку полиэпитопные белки TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 содержат сайты протеолитического расщепления с использованием ферментативных систем эукариотической клетки, что обеспечивает их процессинг, необходимый для связывания освободившихся пептидов с молекулами МНС I и МНС II классов и индукции ответов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Поэтому полноразмерные целевые белки являются нестабильными в клетке.

Подтвердить подверженность полиэпитопных белков протеолитической деградации удалось 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 (плазмида получена от К.О. Баранова, 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. 9Б). Полученные результаты подтверждают гипотезу о нестабильности полноразмерных белков TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 в клетке благодаря включенным в структуру сайтам протеолиза.

### **3.2.2. Внутриклеточная детекция полиэпитопных белков TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 с использованием моноклональных антител 29F2, меченых FITC**

Так как не удалось показать присутствие полноразмерного целевого полиэпитопного белка с использованием вестерн-блот анализа и относительно высокого «фонового» окрашивания (что, вероятнее всего, обусловлено использованием фермента щелочной фосфатазы в иммуноблоттинге), для доказательства экспрессии целевых генов в эукариотических клетках мы использовали высокочувствительный метод внутриклеточной детекции белков на основе проточной цитометрии. Для этого через 48 ч после культивирования клеток 293Т, трансфицированных плазмидами p1, p2 и p3, проводили их фиксацию и пермеабелизацию мембраны с использованием набора

Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD). 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. Анализ образцов осуществляли на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur с использованием предложенного производителем программного обеспечения. В процессе сбора данных клетки 293Т гейтировали по прямому и боковому светорассеиванию, чтобы отсечь дебрис. Далее строили гистограмму, отражающую интенсивность флуоресценции по каналу FL1. На гистограммах определяли область отрицательных значений, отражающих неспецифическое связывание антител и область специфической флуоресценции M1, демонстрирующую наличие эпитопа-маркера ВИЧ-1 в эукариотических клетках, с которым специфически связываются МКА 29F2- FITC.

В результате был зарегистрирован пик специфической флуоресценции в области положительных значений по сравнению с отрицательным контрольным образцом (рис. 10).

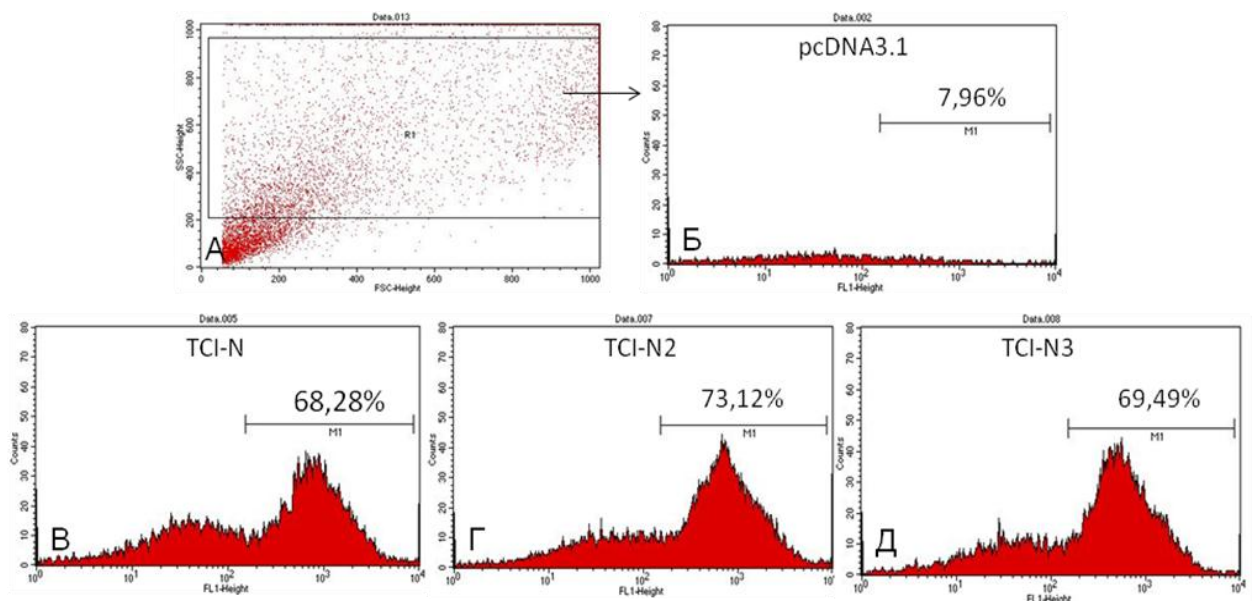


Рисунок 10. Внутриклеточная детекция полиэпитопных белков TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 с помощью МКА 29F2, меченых FITC. А) Гейтирование клеток 293Т; Б), В), Г), Д) Гистограммы, отражающие степень интенсивности свечения по FL1 окрашенных антителами 29F2-FITC клеток 293Т, трансфицированных плазмидами pcDNA3.1, p1, p2 и p3 и содержащих Gag-эпитоп-маркер. M1 – область специфической флуоресценции, подтверждающая наличие Gag-эпитопа-маркера в эукариотических клетках, с которым специфически связываются антитела

Данный метод подтверждает экспрессию генов, кодирующих полиэпитопные иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 в составе ДНК-плазмиды, и синтез полиэпитопных белков в эукариотических клетках.

### **3.3. Исследование иммуногенности ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих полиэпитопные иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3**

#### **3.3.1. Иммунизация лабораторных животных сконструированными ДНК-вакцинными конструкциями и сбор образцов**

Иммуногенность полученных ДНК-вакцинных конструкций была исследована на модели лабораторных мышей инбредной линии BALB/с. Группы мышей (N = 30) иммунизировали рекомбинантными плазмидами в соответствии со схемой (рис. 11). Для получения отрицательных контрольных образцов проводили иммунизацию мышей (N = 7) векторной плазмидой pcDNA3.1. В качестве положительного контроля для иммунизации мышей (N = 30) использовали плазмиду pcDNA-TCI – компонент вакцины «КомбиВИЧвак».

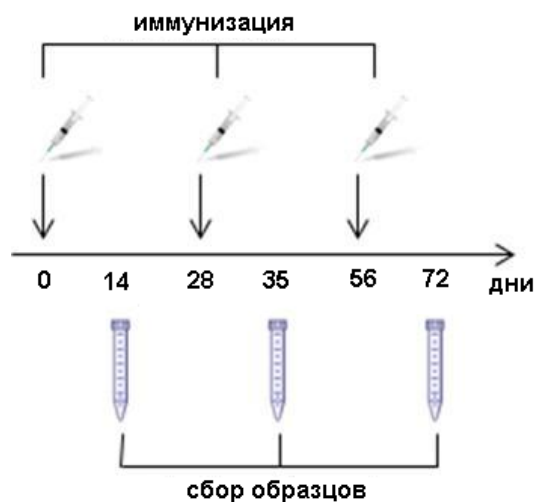


Рисунок 11. Схема иммунизации и сбора образцов

Для исследования клеточного иммунного ответа после каждой иммунизации проводили забой части иммунизированных животных (N = 10 в каждой группе) в соответствии со схемой эксперимента с целью получения клеточных образцов (рис. 11). Данная схема была основана на сведениях о том, что адаптивный ответ Т-лимфоцитов на вакцинные антигены формируется в течение 14 – 28 дней после первой иммунизации, бустирование с интервалами в 28 дней позволит повысить



величину ВИЧ-специфического Т-клеточного ответа, а ответ антиген-специфических Т-клеток памяти регистрируется уже после 70 дней от начала первой иммунизации.

### **3.3.1.1. Выбор параметров для исследования ВИЧ-специфического иммунного ответа, индуцированного вакцинацией**

Учитывая многообразие Т-клеточных эффекторных функций и их роль в контроле вируса ВИЧ-1, необходимым этапом работы стал выбор параметров для исследования иммуногенности сконструированных ДНК-вакцин на модели лабораторных животных.

Одной из трудностей при оценке эффективности вакцины против ВИЧ является то, что на сегодняшний день до конца не определены параметры Т-клеточного иммунного ответа, обеспечивающего защиту от заражения ВИЧ-1 и развития заболевания. Качественные аспекты иммунного контроля ВИЧ-1, как правило, были почерпнуты из исследований за ВИЧ-нонпрогрессорами, а также элитными контроллерами (пациенты, инфицированные ВИЧ-1, способные без антиретровирусной терапии сохранять стабильный уровень CD4+ Т-клеток и вирусную нагрузку менее 50 копий/мл) (Koup and Douek, 2011). Сравнивая профили продукции цитокинов Т-клетками элитных контроллеров с этими же профилями у хронических ВИЧ-прогрессоров, были определены несколько ключевых характеристик при контроле ВИЧ-инфекции. В исследовании секреции цитокинов IL-2, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  Т-лимфоцитами общее число эффекторных клеток не отличалось в этих группах ВИЧ-инфицированных, но CD8+ Т-клетки элитных контроллеров были способны продуцировать больше цитокинов на уровне одной клетки, чем прогрессоры (Betts *et al.*, 2006; Akinsiku *et al.*, 2011). У индивидуумов с устойчивостью к ВИЧ-инфекции CD4+ Т-клеточный ответ имел явно выраженный Th1 тип (Reuter *et al.*, 2012). Также показано, что ВИЧ-инфекция связана со сниженной продукцией всех цитокинов Th1 типа Т-хелперов, особенно IL-2 (Wherry *et al.*, 2007) и на ранних стадиях инфекции Th1 тип ответа Т-хелперов доминирует над Th2 типом. CD4+ Т-клетки Th1 типа преимущественно секретируют IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и  $\beta$ -хемокины и считается, что они обеспечивают протективный ответ на внутриклеточные патогены.

Исследования, сравнивающие элитных контроллеров и хронических прогрессоров, показали, что CD8<sup>+</sup> Т клетки, продуцирующие IL-2, коррелируют с высоким уровнем защиты при ВИЧ-инфекции (Akinsiku *et al.*, 2011). Важным показателем является секреция IFN $\gamma$ , которая ассоциируется с Т-клеточной активацией, стимулирует клеточную цитотоксичность (Tsujimoto, 1986; Xu, 1998; Schroder, 2004) и является наиболее общим показателем для исследования антиген-специфического Т-клеточного ответа (в методиках ELISpot и проточной цитометрии). Детекция IFN $\gamma$  стала стандартным показателем в испытаниях эффективности вакцин и терапии, разработанных для стимуляции Т-клеточного ответа (Reese *et al.*, 2004).

Таким образом, в данной работе в качестве ключевых параметров для сравнительного исследования иммуногенности сконструированных полиэпитопных конструкций было установление способности CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов продуцировать IL-2 и IFN $\gamma$ . Секреция этих цитокинов соответствуют Th1 типу CD4<sup>+</sup> Т-клеточного ответа, который индуцирует пролиферацию и дифференцировку специфических цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и способствует контролю виремии.

### **3.3.1.2. Выбор метода и протокола для исследования ВИЧ-специфического иммунного ответа, индуцированного вакцинацией**

Наиболее широко используемые методы для определения продукции цитокинов в рамках изучения разрабатываемых вакцин – ИФА, ELISpot и внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS). В отличие от ИФА, ELISpot и ICS позволяют исследовать продукцию цитокинов на уровне одной клетки, в связи с чем являются полезными для изучения иммунного ответа редких Т-клеточных популяций (Lehmann and Zhang, 2012). ELISpot традиционно используется для исследования Т-клеточного ответа в клинических испытаниях вакцин против ВИЧ, т.к. обладает высокой чувствительностью (De Rosa, 2012). Однако он не обеспечивает информации о фенотипе клеток, продуцирующих цитокины (Saade *et al.*, 2012). В этой связи метод ICS в последнее время применяется чаще благодаря одновременной способности определять спектр цитокинов и фенотип продуцирующих их клеток. Кроме того, ICS также обладает

высокой чувствительностью, сопоставимой с таковой у ELISpot (Maecker *et al.*, 2008; De Rosa, 2012; Saade *et al.*, 2012).

В данной работе представляло интерес изучение продукции цитокинов IL-2 и IFN $\gamma$  отдельными популяциями Т-клеток – CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами. Подобный дифференцированный анализ позволил осуществить метод ICS.

Способность CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т клеток продуцировать IL-2 и IFN $\gamma$  была изучена с помощью ICS после *in vitro* стимуляции спленоцитов, выделенных у иммунизированных животных. Стимуляцию проводили смесью синтетических пептидов ВИЧ-1, соответствующих выбранным эпитопам (табл. 3).

Таблица 3

Пептиды, рестриктированные молекулами МНС I класса мышей BALB/c, которые использовались для стимуляции спленоцитов

Последовательность <sup>*)</sup> пептидов ВИЧ-1	Локализация в геноме ВИЧ-1
AMQMLKETI	p24(65-73)
IFQSSMTKI	RT(159-167)
EPFRDYVDRF	p24(159-168)
VYYDPSKDLI	RT(317-326)
SYHRLRDFI	gp160(767-775)
SLYNTVATL	p17(77-85)

<sup>\*)</sup> Последовательности пептидов являются точными копиями последовательностей эпитопов, входящих в состав целевых иммуногенов

Для постановки метода ICS стандартный протокол был адаптирован для использования в рамках проведенных экспериментов. Экспериментально установлена рабочая концентрации пептидов ВИЧ-1 для стимуляции спленоцитов, полученных от иммунизированных животных – 20 мкг/мл каждого пептида. Определено оптимальное время стимуляции спленоцитов – 18 ч и время культивирования с добавлением ингибитора транспорта белков BD GolgiStop – 5 ч.

Для анализа клеточных образцов на проточном цитометре BD FACSCalibur использована следующая схема гейтирования (рис. 12). В процессе сбора данных лимфоциты гейтировали по прямому (FSC) и боковому светорассеиванию (SSC) и выделяли среди них Т-лимфоциты, несущие CD3 – маркер направленной дифференцировки Т-клеток, что позволяло отличать их от В-клеток. Затем гейтировали популяцию CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и определяли популяции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на отдельных графиках. Далее

гейтировали популяцию  $CD3+CD4+$  и определяли процент  $CD4+IL-2+$  и  $CD4+IFN\gamma+$  Т-клеток. На другом графике гейтировали популяцию  $CD3+CD8+$  и определяли процент  $CD8+IL-2+$  и  $CD8+IFN\gamma+$  Т-лимфоцитов. Обработку данных проводили с использованием программного обеспечения BD CellQuest.

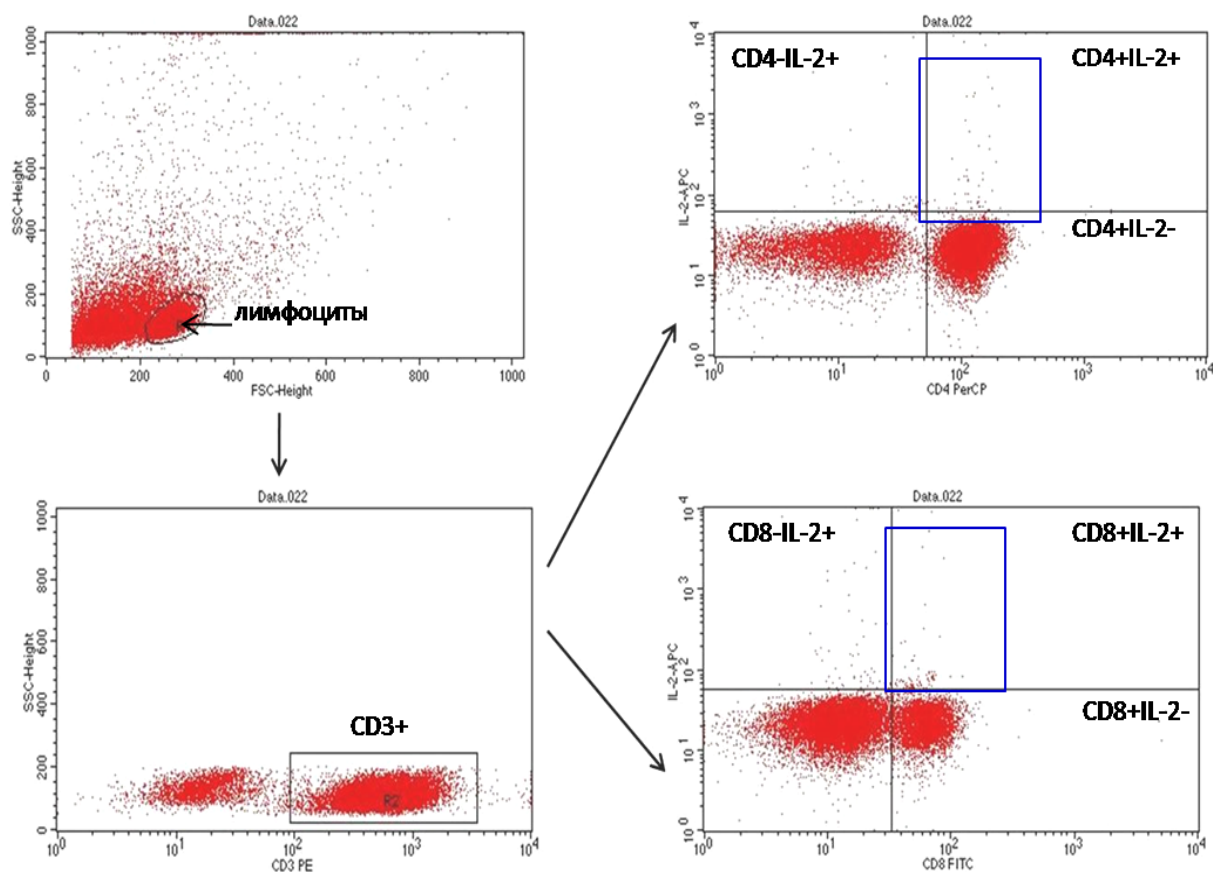


Рисунок 12. Общая схема гейтирования для фенотипирования и определения продукции цитокинов Т-лимфоцитами мышей линии BALB/c, иммунизированных рекомбинантными плазмидами, кодирующими иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3

Данные индивидуальных измерений ВИЧ-специфических ответов IL-2- и IFN $\gamma$ -продуцирующих  $CD4+$  и  $CD8+$  Т-лимфоцитов, выделенных у одно-, двух- и трехкратно иммунизированных мышей BALB/c, представлены в таблицах 3–5. Результаты статистической обработки приведены на рис. 13–16.

Таблица 4

Продукция IL-2 и IFN $\gamma$  CD4 $^{+}$  и CD8 $^{+}$  Т-лимфоцитами после первой иммунизации мышей линии BALB/c (14-й день от начала эксперимента)

№ живот-ного	Иммуноген					CD4+ IL-2*	CD4+ IFN $\gamma$ *	CD8+ IL-2*	CD8+ IFN $\gamma$ *
	pcDNA3.1	TCI-N	TCI-N2	TCI-N3	TCI				
1	+	-	-	-	-	0,02	0,02	0,02	0,01
2	+	-	-	-	-	0,02	0,03	0,05	0,03
3	+	-	-	-	-	0,02	0,01	0,03	0,03
4	+	-	-	-	-	0,01	0,02	0,05	0,03
5	+	-	-	-	-	0,01	0,03	0,05	0,02
6	+	-	-	-	-	0,02	0,03	0,04	0,03
7	+	-	-	-	-	0,02	0,02	0,05	0,05
1	-	+	-	-	-	0,44	0,68	1,53	0,22
2	-	+	-	-	-	0,45	0,30	0,89	0,15
3	-	+	-	-	-	0,09	0,30	0,87	0,75
4	-	+	-	-	-	0,37	0,24	0,66	0,68
5	-	+	-	-	-	0,19	0,35	0,89	1,07
6	-	+	-	-	-	0,28	0,20	0,80	0,60
7	-	+	-	-	-	0,26	0,29	0,76	0,76
8	-	+	-	-	-	0,30	0,27	0,68	0,67
9	-	+	-	-	-	0,28	0,22	0,88	0,86
10	-	+	-	-	-	0,45	0,36	0,84	0,56
1	-	-	+	-	-	0,59	0,40	0,91	0,92
2	-	-	+	-	-	0,86	0,09	0,48	0,17
3	-	-	+	-	-	0,24	0,31	0,30	1,04
4	-	-	+	-	-	0,25	0,25	0,44	0,84
5	-	-	+	-	-	0,27	0,27	0,68	1,07
6	-	-	+	-	-	0,71	0,50	2,66	1,30
7	-	-	+	-	-	0,27	0,17	0,72	0,79
8	-	-	+	-	-	0,14	0,69	0,73	2,52
9	-	-	+	-	-	0,63	0,30	1,41	0,74
10	-	-	+	-	-	0,44	2,05	1,38	1,96
1	-	-	-	+	-	0,46	0,43	0,35	0,50
2	-	-	-	+	-	0,82	0,44	1,25	0,57
3	-	-	-	+	-	0,41	0,35	0,47	0,42
4	-	-	-	+	-	1,03	0,83	1,52	0,56
5	-	-	-	+	-	0,28	0,84	0,32	0,56
6	-	-	-	+	-	0,50	0,84	1,21	1,01
7	-	-	-	+	-	0,60	0,91	1,28	0,41
8	-	-	-	+	-	0,44	0,78	1,21	0,68
9	-	-	-	+	-	0,51	1,09	1,57	0,32
10	-	-	-	+	-	0,41	0,94	1,32	0,35
1	-	-	-	-	+	0,57	0,64	0,37	0,55
2	-	-	-	-	+	0,42	1,33	0,06	0,92
3	-	-	-	-	+	1,46	0,54	0,30	0,72
4	-	-	-	-	+	0,46	0,33	0,39	0,38
5	-	-	-	-	+	0,38	0,49	0,38	0,65
6	-	-	-	-	+	0,59	0,36	0,88	0,61
7	-	-	-	-	+	0,59	0,47	0,62	0,66
8	-	-	-	-	+	0,23	0,54	0,25	1,08
9	-	-	-	-	+	0,55	1,18	0,32	0,35
10	-	-	-	-	+	0,73	1,22	0,25	0,28

\* % цитокин-продуцирующих клеток в популяции CD4 $^{+}$  или CD8 $^{+}$  Т-клеток

Таблица 5

Продукция IL-2 и IFN $\gamma$  CD4 $^{+}$  и CD8 $^{+}$  Т-лимфоцитами после второй иммунизации мышей линии BALB/c (35-й день от начала эксперимента)

№ живот- ного	Иммуноген				CD4 $^{+}$ IL-2*	CD4 $^{+}$ IFN $\gamma$ *	CD8 $^{+}$ IL-2*	CD8 $^{+}$ IFN $\gamma$ *
	TCI-N	TCI-N2	TCI-N3	TCI				
1	+	-	-	-	0,57	0,80	0,27	0,23
2	+	-	-	-	0,49	0,55	0,28	0,37
3	+	-	-	-	0,53	0,51	0,35	0,47
4	+	-	-	-	0,47	0,35	0,27	0,50
5	+	-	-	-	0,39	0,33	0,35	0,42
6	+	-	-	-	0,38	0,50	0,18	0,43
7	+	-	-	-	0,34	0,24	0,39	0,41
8	+	-	-	-	0,27	0,28	0,29	0,15
9	+	-	-	-	0,20	0,32	0,21	0,23
10	+	-	-	-	0,41	0,81	0,66	0,23
1	-	+	-	-	0,49	0,59	0,58	0,66
2	-	+	-	-	0,21	0,64	0,46	0,86
3	-	+	-	-	0,10	0,25	0,43	0,39
4	-	+	-	-	0,09	0,31	0,18	0,49
5	-	+	-	-	0,13	0,28	0,21	0,41
6	-	+	-	-	0,28	0,67	0,37	0,58
7	-	+	-	-	0,25	0,72	0,27	0,86
8	-	+	-	-	0,29	0,58	0,66	0,51
9	-	+	-	-	0,21	0,82	0,35	1,00
10	-	+	-	-	0,37	0,63	0,22	0,58
1	-	-	+	-	0,45	0,25	0,4	0,30
2	-	-	+	-	0,34	0,77	0,19	0,71
3	-	-	+	-	0,24	0,83	0,07	0,55
4	-	-	+	-	0,39	0,69	0,29	0,63
5	-	-	+	-	0,47	0,31	0,36	0,20
6	-	-	+	-	0,38	0,20	0,23	0,97
7	-	-	+	-	0,14	0,68	0,17	0,58
8	-	-	+	-	0,31	0,84	0,48	0,74
9	-	-	+	-	0,47	0,47	0,62	0,54
10	-	-	+	-	0,53	0,71	0,49	0,66
1	-	-	-	+	1,06	0,93	0,75	0,56
2	-	-	-	+	0,38	0,74	0,62	0,73
3	-	-	-	+	0,63	0,53	0,62	0,71
4	-	-	-	+	0,31	1,03	0,33	0,55
5	-	-	-	+	1,06	0,81	0,74	0,73
6	-	-	-	+	1,12	1,03	1,31	1,80
7	-	-	-	+	0,93	0,64	0,73	1,21
8	-	-	-	+	0,77	0,92	0,77	0,43
9	-	-	-	+	0,95	0,67	1,85	1,78

\* % цитокин-продуцирующих клеток в популяции CD4 $^{+}$  или CD8 $^{+}$  Т-клеток

Таблица 6

Продукция IL-2 и IFN $\gamma$  CD4 $^{+}$  и CD8 $^{+}$  Т-лимфоцитами после третьей иммунизации мышей линии BALB/c (72-й день от начала эксперимента)

№ живот ного	Иммуноген				CD4 $^{+}$ IL-2*	CD4 $^{+}$ IFN $\gamma$ *	CD8 $^{+}$ IL-2*	CD8 $^{+}$ IFN $\gamma$ *
	TCI-N	TCI-N2	TCI-N3	TCI				
1	+	-	-	-	0,28	0,09	0,06	0,01
2	+	-	-	-	0,22	0,18	0,04	0,04
3	+	-	-	-	0,54	0,09	0,09	0,01
4	+	-	-	-	0,46	0,27	0,06	0,05
5	+	-	-	-	0,24	0,21	0,04	0,07
6	+	-	-	-	0,19	0,10	0,01	0,01
7	+	-	-	-	0,16	0,32	0,06	0,01
8	+	-	-	-	0,16	0,14	0,04	0,02
9	+	-	-	-	0,16	0,14	0,02	0,05
10	+	-	-	-	0,56	0,15	0,05	0,02
1	-	+	-	-	0,25	0,29	0,55	0,43
2	-	+	-	-	0,25	0,39	0,78	1,40
3	-	+	-	-	0,40	0,24	0,94	0,83
4	-	+	-	-	0,34	0,30	0,91	0,89
5	-	+	-	-	0,37	0,26	0,93	0,55
6	-	+	-	-	0,26	0,42	0,51	0,67
7	-	+	-	-	0,82	0,60	1,55	1,06
8	-	+	-	-	1,10	0,79	1,38	0,68
9	-	+	-	-	0,53	0,40	0,71	0,87
10	-	+	-	-	0,47	0,60	0,63	0,69
1	-	-	+	-	1,42	1,46	1,59	1,69
2	-	-	+	-	1,28	1,26	2,09	0,85
3	-	-	+	-	0,83	0,43	1,70	0,73
4	-	-	+	-	0,93	0,89	1,15	1,25
5	-	-	+	-	1,63	1,17	2,02	1,95
6	-	-	+	-	0,57	0,51	0,87	0,83
7	-	-	+	-	0,57	0,69	1,31	1,51
8	-	-	+	-	0,73	1,09	1,89	2,25
9	-	-	+	-	0,65	0,60	2,14	0,95
10	-	-	+	-	1,52	0,25	2,34	1,83
1	-	-	-	+	0,23	0,24	0,40	0,45
2	-	-	-	+	0,30	0,23	0,24	1,31
3	-	-	-	+	0,35	0,34	0,37	0,62
4	-	-	-	+	0,51	0,47	0,74	1,59
5	-	-	-	+	0,75	0,44	0,73	0,88
6	-	-	-	+	0,34	0,35	0,12	1,04
7	-	-	-	+	0,35	0,40	0,28	1,01
8	-	-	-	+	0,23	0,28	0,25	0,51
9	-	-	-	+	0,98	0,78	0,54	0,84
10	-	-	-	+	0,40	0,45	0,16	0,40

\* % цитокин-продуцирующих клеток в популяции CD4 $^{+}$  или CD8 $^{+}$  Т-клеток

### 3.3.3. Изучение способности искусственных полиэпигенных иммуногенов TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 стимулировать ВИЧ-специфические ответы CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов

Первоначальным этапом исследования иммуногенности полученных ДНК-вакцинных конструкций было определение способности Т-клеточных иммуногенов TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 вызывать ВИЧ-специфический CD4+ и CD8+ Т-клеточный ответ. Для этого группы мышей линии BALB/c были иммунизированы трехкратно в результате внутримышечной инъекции 100 мкг рекомбинантных плазмид р1, р2 и р3 (N=10 мышей в группе) с интервалами 28 дней. Отрицательным контролем являлась группа мышей (N=7), которым вводили векторную плазмиду pcDNA3.1. После каждой иммунизации полученными ДНК-вакцинными конструкциями исследовался CD4+ и CD8+ Т-клеточный ответ. Полученные статистически обработанные данные приведены на рис. 13–16.

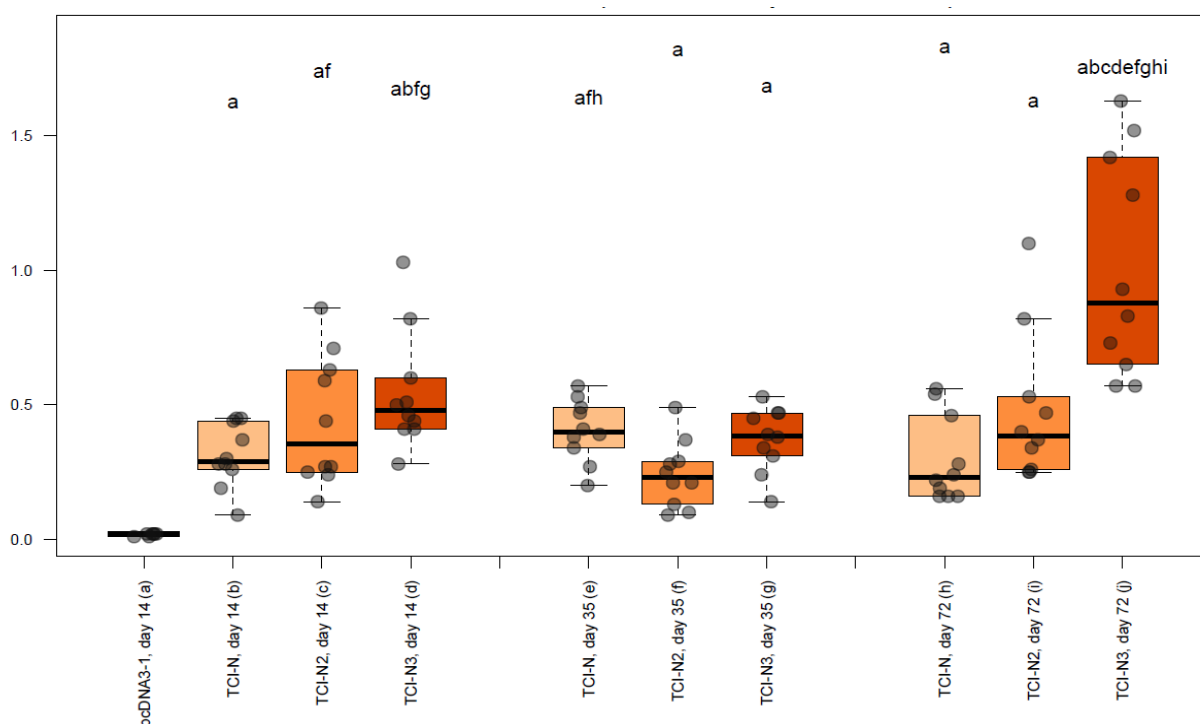


Рисунок 13. Продукция IL-2 CD4+ Т-лимфоцитами на 14-й, 35-й и 72-й день эксперимента ( $P \leq 0,05$ ). % IL-2-продуцирующих CD4+ Т-лимфоцитов (от общего числа CD4+ Т-клеток) показан на оси Y. Различные сроки забора клеточных образцов у иммунизированных животных отображены на оси X



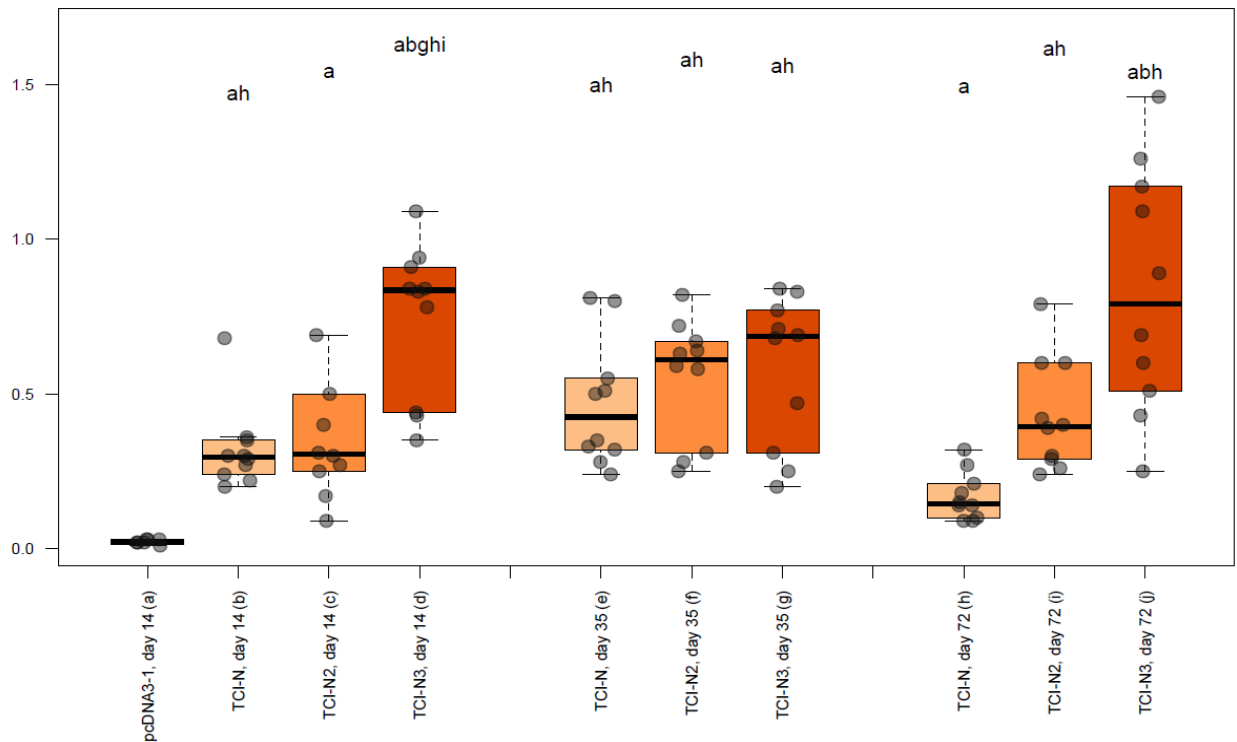


Рисунок 14. Продукция  $\text{IFN}\gamma$   $\text{CD4}^+$  Т-лимфоцитами на 14-й, 35-й и 72-й день эксперимента ( $P \leq 0,05$ ). %  $\text{IFN}\gamma$ -продуцирующих  $\text{CD4}^+$  Т-лимфоцитов (от общего числа  $\text{CD4}^+$  Т-клеток) показан на оси Y. Различные сроки забора клеточных образцов у иммунизированных животных отображены на оси X

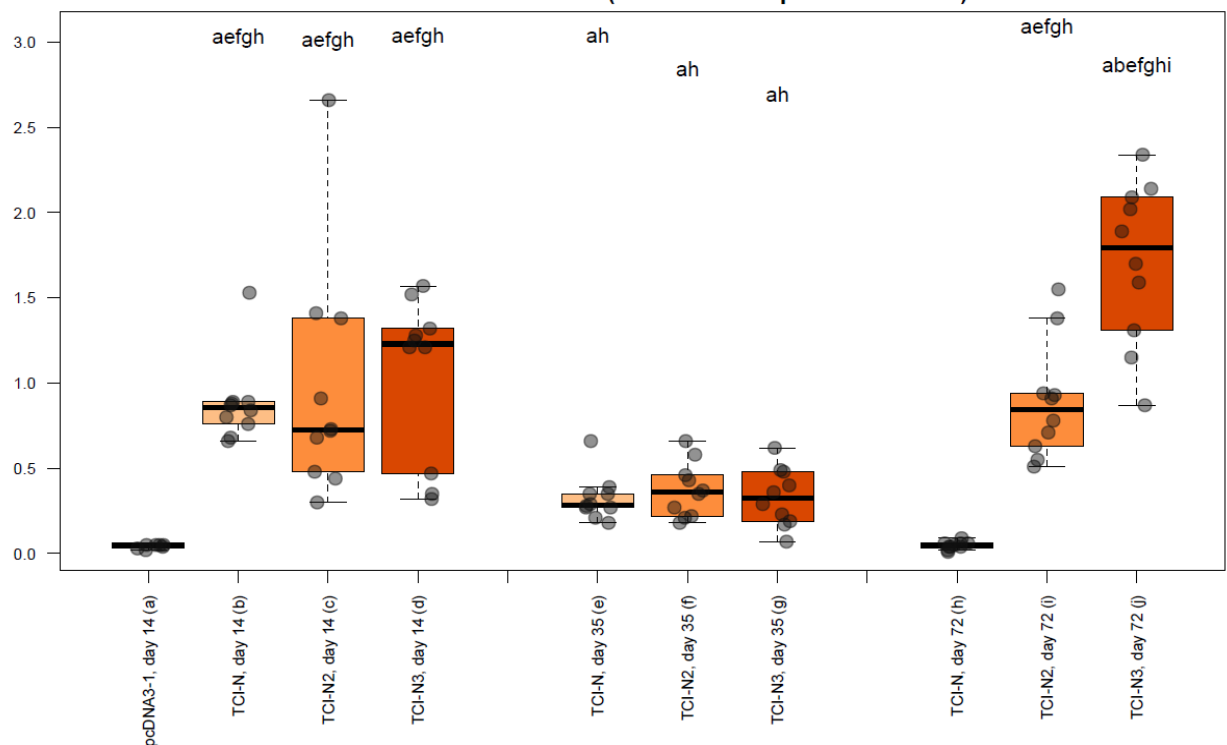


Рисунок 15. Продукция IL-2  $\text{CD8}^+$  Т-лимфоцитами на 14-й, 35-й и 72-й день эксперимента ( $P \leq 0,05$ ). % IL-2-продуцирующих  $\text{CD8}^+$  Т-лимфоцитов (от общего числа  $\text{CD8}^+$  Т-клеток) показан на оси Y. Различные сроки забора клеточных образцов у иммунизированных животных отображены на оси X

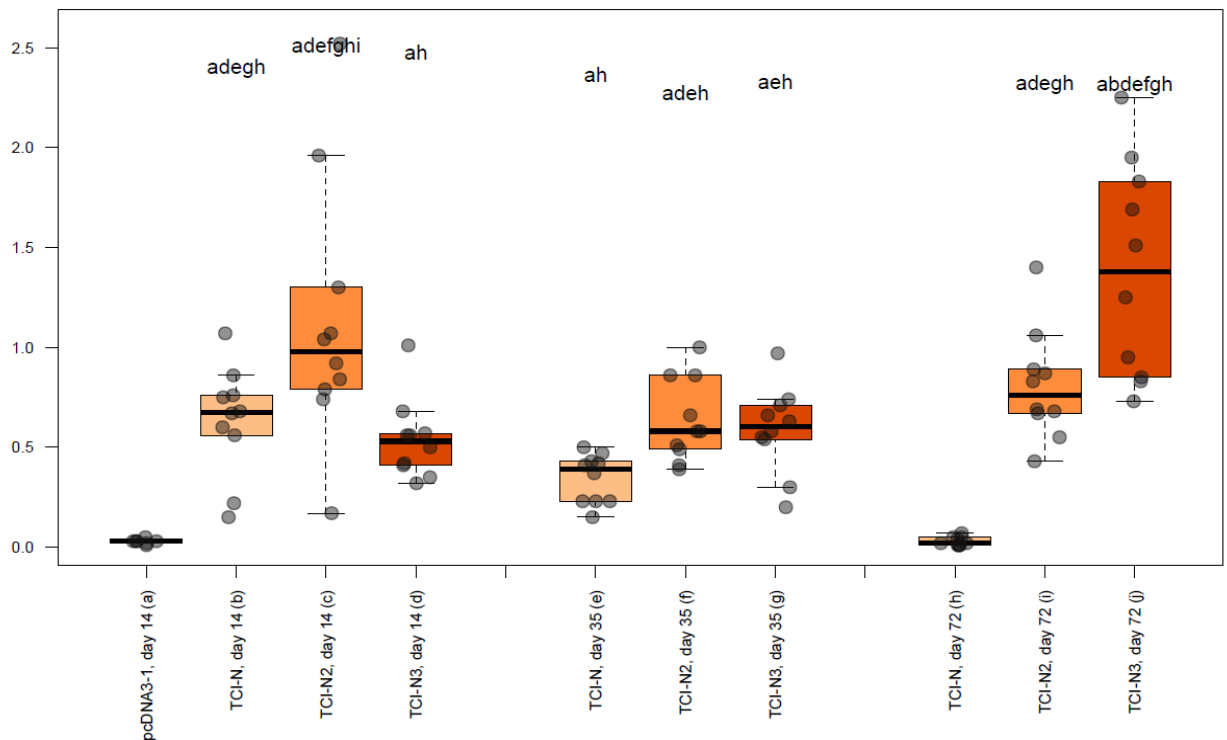


Рисунок 16. Продукция  $\text{IFN}\gamma$   $\text{CD8}^+$  Т-лимфоцитами на 14-й, 35-й и 72-й день эксперимента ( $P \leq 0,05$ ). %  $\text{IFN}\gamma$ -продуцирующих  $\text{CD8}^+$  Т-лимфоцитов (от общего числа  $\text{CD8}^+$  Т-клеток) показан на оси Y. Различные сроки забора клеточных образцов у иммунизированных животных отображены на оси X

Мы обнаружили, что все исследуемые группы животных, иммунизированных ДНК-плазмидами, кодирующими полиэпитопные иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3, вызывали ВИЧ-специфический  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$  Т-клеточный ответ. После каждой иммунизации рекомбинантными плазмидами, кодирующими искусственные ВИЧ-иммуногены, в группах мышей уровни продукции IL-2 и  $\text{IFN}\gamma$   $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$  Т-лимфоцитами были достоверно выше ( $P \leq 0,05$ ), чем в отрицательной контрольной группе животных, которым вводили векторную плазмиду pcDNA3.1 (рис. 13–16).

Таким образом, была продемонстрирована способность ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих полиэпитопные ВИЧ-1 Т-клеточные иммуногены, индуцировать  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$  Т-клеточный ответ у иммунизированных мышей линии BALB/c. Данный факт свидетельствует о том, что сконструированные на основе компьютерного дизайна искусственные полиэпитопные Т-клеточные иммуногены способны вызывать формирование антиген-специфических  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$  Т-клеток у иммунизированных животных. Кроме того, полученные данные позволяют говорить о том, что спроектированные иммуногены проходят

правильный процессинг в АПК и обеспечивают презентацию освободившихся в результате процессинга эпитопов Т-лимфоцитам. Распознавание вирусных ЦТЛ- и Тх-эпитопов наивными Т-лимфоцитами (прошедших позитивную и негативную селекцию в тимусе, но не имевших контакта с антигеном) в комплексе с молекулами МНС I и МНС II классов ведет к клональной экспансии антиген-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и приобретению ими эффекторных функций.

### **3.3.4. Исследование влияния дополнительных сигнальных последовательностей в структуре полиэпитопных иммуногенов на индукцию ВИЧ-специфических ответов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов**

Следующей задачей данной работы явилось исследование влияния на иммуногенность полиэпитопных конструкций дополнительных N- и С-концевых последовательностей – убиквитина и ER-сигнального пептида (ER-signal) + тирозинового мотива LAMP-1.

Как следует из данных, представленных на рисунках 13–16, 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<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеточного ответа по сравнению с конструкцией, кодирующей иммуноген TCI-N без дополнительных сигнальных последовательностей ( $P \leq 0,05$ ).

Таким образом, в нашем исследовании было показано, что N- и С-концевые сигнальные последовательности, такие как убиквитин и ER-signal (сигнальная последовательность белка E3/gp19K аденовирусов) + мотив LAMP-1 способствуют повышению иммуногенности полиэпитопных ДНК-вакцин.

Полученные результаты косвенно подтверждают теоретические предположения о том, что присоединение ER-сигнального пептида (ER-signal) и мотива LAMP-1 в случае иммуногена TCI-N2 способствует транспорту антигена из цитозоля в лизосому и презентации антигенных пептидов CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам в ассоциации с молекулами МНС II класса. В случае иммуногена TCI-N3 полученные результаты согласуются с данными о том, что присоединение

убиквитина может способствовать презентации эндогенно синтезируемого антигена по пути МНС I класса в результате его убиквитин-зависимой протеасомной деградации и последующей презентацией высвободившихся пептидов CD8+ Т-лимфоцитам (Bauer *et al.*, 2006).

Таким образом, полученные данные находятся в русле современных представлений о том, что повышение эффективности процессинга Т-клеточных эпитопов за счет нацеливания полиэпитопных белков на деградацию в протеасоме или лизосоме ведет к увеличению количества комплексов МНС-пептид на поверхности АПК и способствует усилению иммуногенности конструкции (Grant *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2000).

### **3.3.5. Выбор наиболее эффективной ДНК-вакцинной конструкции, стимулирующей наибольший уровень ВИЧ-специфического CD4+ и CD8+ Т-клеточного ответа**

В рамках данной работы предстояло сравнить иммуногенность сконструированных ДНК-вакцинных конструкций и определить, какая из них обладает наибольшей эффективностью по результатам стимуляции ВИЧ-специфического CD4+ и CD8+ Т-клеточного ответа. Для этого исследовали уровни IL-2 и IFN $\gamma$  продуцирующих CD4+ и CD8+ Т клеток после каждой из трех иммунизаций лабораторных мышей.

#### **3.3.5.1. Исследование ВИЧ-специфического CD4+ Т-клеточного ответа в результате иммунизации ДНК-вакцинными конструкциями, кодирующими полиэпитопные иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3**

На 14-й день после первой иммунизации наибольший ответ IFN $\gamma$ -продуцирующих CD4+ Т-лимфоцитов индуцирует иммуноген TCI-N3, содержащий убиквитин (рис. 14). В группе мышей, иммунизированных рекомбинантной плазмидой, кодирующей этот иммуноген, количество IFN $\gamma$ -продуцирующих CD4+ Т-клеток достоверно выше ( $P \leq 0,05$ ) чем в группах, иммунизированных рекомбинантными плазмидами, кодирующими иммуногены TCI-N и TCI-N2 (рис. 14). Следует отметить, что достоверных отличий в

количестве CD4+ Т-клеток, продуцирующих IFN $\gamma$ , индуцированных иммуногенами TCI-N и TCI-N2, между группами не обнаружено (рис. 14).

Количество CD4+ Т-клеток, секретирующих IL-2 на 14-й день после первой иммунизации, регистрируется примерно на одинаковом уровне во всех группах животных, иммунизированных сконструированными плазмидами (рис. 13). Достоверные различия наблюдаются только между иммуногенами TCI-N и TCI-N3, где TCI-N3 вызывает бóльший уровень продукции IL-2 CD4+ Т-клетками ( $P \leq 0,05$ ) (рис. 14).

Вторая иммунизация плазмидами, кодирующими иммуногены TCI-N и TCI-N2, вызывает повышение медианного значения количества IFN $\gamma$ -продуцирующих CD4+ Т-клеток по сравнению с первой иммунизацией, хотя статистически данные отличия не являются достоверными (рис. 14). Обратный эффект наблюдается в группе мышей, иммунизированных рекомбинантной плазмидой, кодирующей иммуноген TCI-N3 – там среднее значение параметра достоверно снижается по сравнению с первой иммунизацией ( $P \leq 0,05$ ) (рис. 13). Количество IL-2-продуцирующих CD4+ Т-клеток также достоверно снижается после 2-й иммунизации в группах мышей, которым вводили ДНК, экспрессирующую гены полиэпитопных белков TCI-N2 и TCI-N3 ( $P \leq 0,05$ ) (рис. 13). Отсутствие выраженного ответа Т-лимфоцитов, наблюдаемое на седьмой день после второй иммунизации, вероятно, обусловлено тем, что семи дней недостаточно, чтобы вызвать оптимальный ответ CD4+ Т-лимфоцитов.

Различия в степени индукции CD4+ Т-клеточного ответа между исследуемыми иммуногенами наблюдаются после третьей иммунизации. Плазида, кодирующая иммуноген TCI-N3 (Ub\_polyE), достоверно индуцирует наибольший уровень IL-2- и IFN $\gamma$ -продуцирующих CD4+ Т-клеток по сравнению с иммуногенами TCI-N (polyE) и TCI-N2 (ER-signal\_polyE\_LAMP-1) после трехкратной иммунизации ( $P \leq 0,05$ ) (рис. 13, 14). При этом ответы IL-2- и IFN $\gamma$ -продуцирующих CD4+ Т-лимфоцитов, стимулированные конструкцией TCI-N2 (ER-signal\_polyE\_LAMP-1) после первой, второй и третьей иммунизаций, оказались сопоставимыми, а ответ IFN $\gamma$ -продуцирующих CD4+ Т-лимфоцитов, вызванный иммуногеном TCI-N (polyE), после третьей иммунизации оказался достоверно ниже, чем после первой и второй иммунизаций (рис. 13, 14).

### 3.3.5.2. Исследование ВИЧ-специфического CD8<sup>+</sup> Т-клеточного ответа в результате иммунизации ДНК-вакцинными конструкциями, кодирующими полиэпитопные иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3

Сравнительный анализ ВИЧ-специфического CD8<sup>+</sup> Т-клеточного ответа, вызванного ДНК-вакцинными конструкциями, показал, что на 14-й день после первой иммунизации максимальный статистически значимый ( $P \leq 0,05$ ) уровень IFN $\gamma$ -продуцирующих CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов индуцирует иммуноген TCI-N2, содержащий ER-signal + LAMP-1 (рис. 16). Можно предположить, что в данном случае часть молекул иммуногена, нацеленных на эндоплазматический ретикулум с помощью N-концевого сигнального пептида (ER-signal – сигнальная последовательность белка E3/gp19K аденовирусов), может презентироваться как по пути МНС II класса (за счёт тирозинового мотива LAMP-1), так и по пути МНС I класса в результате механизма, названного кросс-презентацией (Thalhamer, 2011). Действительно, некоторые исследования показали, что присутствие ER-сигнальной последовательности на N-конце молекулы антигена обеспечивает его проникновение в эндоплазматический ретикулум с помощью ТАР-независимого механизма, где антиген может процессироваться с помощью ER-протеаз. Полученные в результате протеолиза фрагменты (эпитопы) антигена могут таким образом представляться на поверхности АПК в комплексе с молекулами МНС I класса (Anderson *et al.*, 1991; Bacik *et al.*, 1994; Rice *et al.*, 1999).

Все три сконструированные плазмиды индуцируют сопоставимые количества IL-2-продуцирующих CD8<sup>+</sup> Т-клеток, т.к. достоверных различий между группами не наблюдается (рис. 15). Сходная ситуация оказалась на 14-й день после первой иммунизации в случае CD4<sup>+</sup> Т-клеток, секретирующих IL-2 (рис. 13).

Определение количества IFN $\gamma$ -продуцирующих CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на седьмой день после второй иммунизации в группе животных, которым вводили плазмиду, кодирующую TCI-N3, не выявило достоверных изменений по сравнению с группой однократно иммунизированных животных (рис. 16). Более того, уровень IFN $\gamma$ -продуцирующих CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с группам животных, иммунизированных конструкциями, кодирующими иммуногены TCI-N и TCI-N2,

оказался сниженным после второй иммунизации вакцинами по сравнению с группой однократно иммунизированных животных (рис. 16). Кроме того, уровень IL-2-продуцирующих CD8+ Т-клеток во всех экспериментальных группах оказался достоверно ниже ( $P \leq 0,05$ ) на седьмой день после второй иммунизации (рис. 15). По-видимому, как и в случае ответа CD4+ Т-лимфоцитов, низкий уровень ответа CD8+ Т-лимфоцитов, наблюдаемый на седьмой день после второй иммунизации, обусловлен тем, что семи дней недостаточно, чтобы вызвать оптимальный ответ CD8+ Т-клеток.

Третья иммунизация позволила чётко ранжировать ДНК-вакцинные конструкции по иммуногенности. Самой неэффективной оказалась конструкция, кодирующая иммуноген TCI-N. Ответы как IL-2, так и IFN $\gamma$ -продуцирующих CD8+ Т-лимфоцитов после трехкратной иммунизации оказались самыми низкими на уровне отрицательного контроля, в качестве которого служила группа животных которым вводилась векторная плазмида (рис. 15 и 16).

В группе животных, трехкратно иммунизированных плазмидой, кодирующей иммуноген TCI-N2, ответ IL-2-продуцирующих CD8+ Т-лимфоцитов был достоверно выше ( $P \leq 0,05$ ) по сравнению с группой животных двукратно иммунизированных этой же плазмидой (рис. 15). В тоже время ответы IFN $\gamma$ -продуцирующих CD8+ Т-лимфоцитов в этих экспериментальных группах достоверно не различались (рис. 16).

После трехкратной иммунизации самые высокие ответы как IL-2, так и IFN $\gamma$ -продуцирующих CD8+ Т-лимфоцитов наблюдаются в группе животных, иммунизированных плазмидой, кодирующей иммуноген TCI-N3 (рис. 15 и 16). При этом эти ответы также достоверно превышают соответствующие ответы IL-2 и IFN $\gamma$ -продуцирующих CD8+ Т-лимфоцитов в группах двукратно иммунизированных животных.

В целом 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<sup>+</sup> 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 высвобождаться 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<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, которые, как известно, усиливают ответы CD8<sup>+</sup> ЦТЛ.

Таким образом, в данной работе было проведено изучение и сравнение уровней IL-2- и IFN $\gamma$ -продуцирующих CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в результате иммунизации лабораторных мышей линии BALB/c полученными ДНК-вакцинными конструкциями на основе полиэпитопных иммуногенов TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3. В результате была определена наиболее эффективная конструкция – TCI-N3 (Ub\_polyE) и, соответственно, предпочтительная стратегия проектирования искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов для формирования ВИЧ-специфического CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеточного ответа.

### **3.3.6. Можно ли путем оптимизации структуры иммуногена получить вакцину, которая по иммуногенности будет превосходить вакцины, полученные на основе нативных антигенов?**

Для повышения иммуногенности полиэпитопных ДНК-вакцинных конструкций целевые Т-клеточные иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 разрабатывались с использованием различных стратегий, оптимизирующих процессинг полиэпитопного белка и презентацию освободившихся эпитопов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам. Возникает вопрос: способны ли предложенные стратегии оптимизации структуры искусственных иммуногенов усилить Т-клеточные ответы по сравнению с неоптимизированными антигенами? В качестве такого неоптимизированного антигена был выбран иммуноген TCI, который кодируется в составе рекомбинантной плазмиды pcDNA-TCI, являющейся компонентом вакцины «КомбиВИЧвак». Следует отметить, что белок TCI был первым искусственным Т-клеточным иммуногеном, который был разработан в ГНЦ ВБ «Вектор». В отличие от иммуногенов TCI-N, TCI-N2 и



TCI-N3, которые были сконструированы на основе индивидуальных эпитопов, белок TCI спроектирован на основе последовательностей фрагментов белков ВИЧ-1 Gag, Env, Pol и Nef, содержащих перекрывающиеся Т-клеточные эпитопы. Поэтому взаимное расположение Т-клеточных эпитопов в составе выбранных фрагментов полностью соответствует их нативной локализации (Bazhan *et al.*, 2004). На стадии доклинических исследований с использованием модели мышей линии BALB/с ДНК-вакцина pcDNA-TCI продемонстрировала в ELISpot свою эффективность в отношении индукции Т-клеточного ответа как сама по себе, так и в составе вакцины «КомбиВИЧвак» (Bazhan *et al.*, 2004, 2008; Karpenko *et al.*, 2004, 2007). Учитывая, что ДНК-вакцина pcDNA-TCI, также как и ДНК-вакцинные конструкции p1, p2 и p3, клонирована в векторной плазмиде pcDNA3.1, она является наиболее подходящим положительным контролем для сравнительной оценки иммуногенности полученных конструкций. Следует однако отметить, что в состав иммуногенов TCI-N, TCI-N2, TCI-N3 по сравнению с TCI входят различные эпитопы, поэтому можно провести лишь относительное сопоставление различий между оптимизированной и неоптимизированной внутренней структурой иммуногенов. Полученные результаты представлены на рисунке 20.

Как следует из данных на рисунке 20А, после первой и второй иммунизаций наибольший уровень ВИЧ-специфических IL-2-продуцирующих CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов демонстрируют животные, иммунизированные плазмидой pcDNA-TCI. Эта же группа животных показала максимальное количество ВИЧ-специфических IFN $\gamma$ -секретирующих CD4<sup>+</sup> клеток, но только после второй иммунизации (рис. 17В). После первой иммунизации количество антиген-специфических IFN $\gamma$ -продуцирующих CD4<sup>+</sup> клеток, индуцированных ДНК-вакциной pcDNA-TCI, был выше, чем в группах, иммунизированных плазмидами p1 и p2, кодирующими TCI-N (polyE) и TCI-N2 (ER-signal\_polyE\_LAMP-1) иммуногены, но ниже, чем в группе, иммунизированной плазмидой p3, кодирующий TCI-N3 иммуноген. После третьей иммунизации максимальные статистически значимые уровни как IL-2-, так и IFN $\gamma$ -продуцирующих CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов были зафиксированы в группе животных, иммунизированных плазмидой p3, кодирующий TCI-N3 (Ub\_polyE)

иммуноген, содержащий N-концевой убиквитин. В группе животных, иммунизированных контрольной плазмидой pcDNA-TCI, количества IL-2- и IFN $\gamma$ -продуцирующих CD4+ Т-лимфоцитов не отличались от таковых в группе, иммунизированной плазмидой, кодирующей иммуноген TCI-N2 (ER-signal\_polyE\_LAMP-1), но были выше по сравнению с группой, иммунизированной плазмидой, кодирующей иммуноген TCI-N (polyE).

Также как и в случае ответов CD4+ Т-лимфоцитов, количество IL-2- и IFN $\gamma$ -продуцирующих CD8+ Т-лимфоцитов после второй иммунизации было максимальным в группе животных, иммунизированных плазмидой pcDNA-TCI. Ответы CD8+ Т-лимфоцитов после третьей иммунизации были самыми высокими в группе животных, иммунизированных плазмидой p3, кодирующий TCI-N3 (Ub\_polyE) иммуноген, содержащий N-концевой убиквитин (рис. 17 Б, Г). Если сравнивать ответы CD8+ Т-лимфоцитов в группах животных, иммунизированных плазмидами pcDNA-TCI (контроль) и p2 (опыт) после третьей иммунизации, то количество IL-2-продуцирующих CD8+ Т-лимфоцитов было выше в контрольной группе, а IFN $\gamma$ -секретирующих CD8+ Т-лимфоцитов было выше в опытной группе. Следует отметить, что ответы CD4+ Т-лимфоцитов, индуцированные после третьей иммунизации плазмидой p3, достоверно не отличаются от таковых, стимулированных введением контрольной плазмиды pcDNA-TCI после второй иммунизации. В тоже время количество как IL-2-, так и IFN $\gamma$ -продуцирующих CD8+ Т-лимфоцитов после трёхкратной иммунизации плазмидой p3 были достоверно выше по сравнению с таковыми после второй иммунизации плазмидой pcDNA-TCI. Таким образом, среди трех оптимизированных конструкций – TCI-N (polyE), TCI-N2 (ER-signal\_polyE\_LAMP-1) и TCI-N3 (Ub\_polyE) – только одна, а именно TCI-N3 (Ub\_polyE), оказалась более иммуногенной в отношении индукции ВИЧ-специфических IL-2- и IFN $\gamma$ -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.

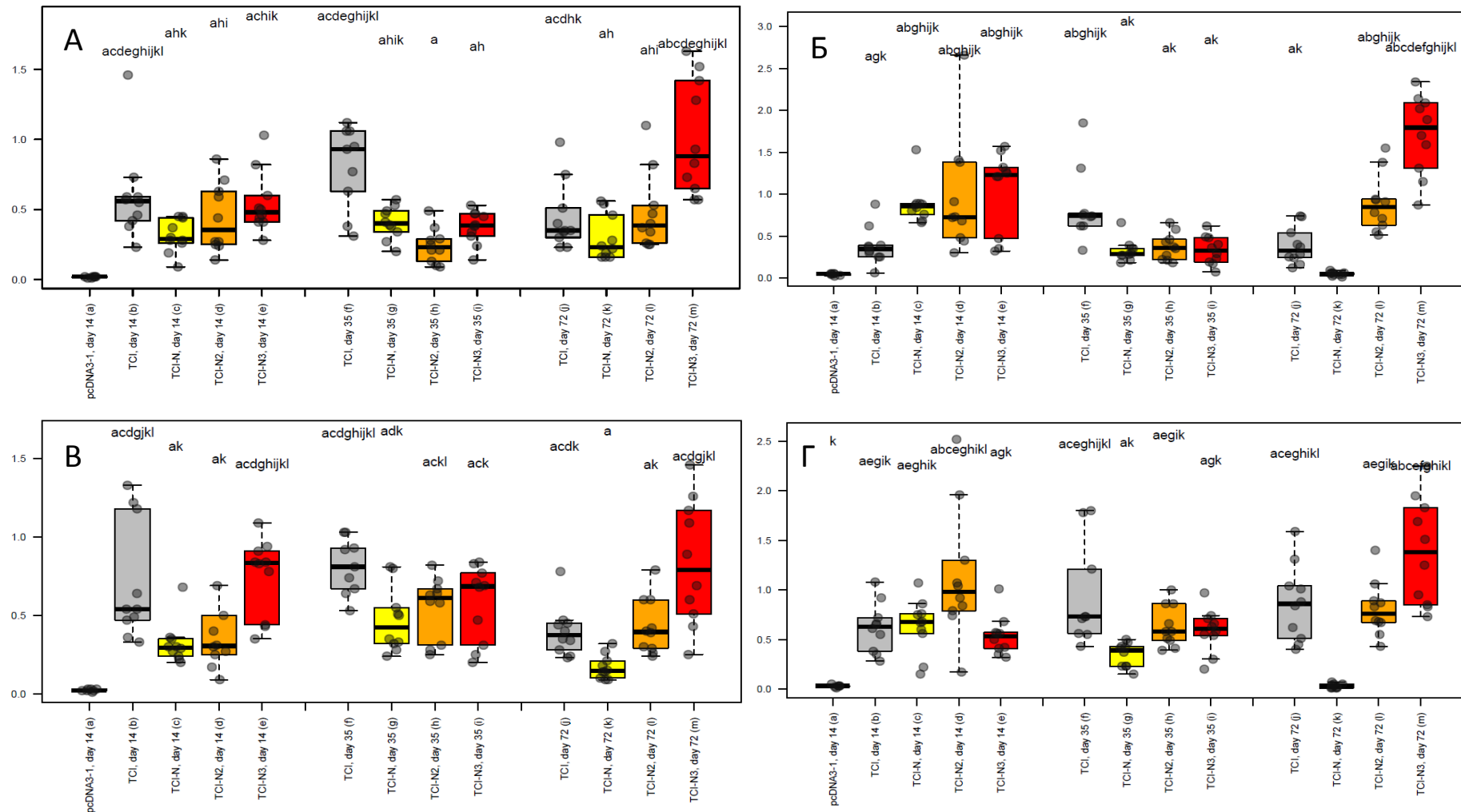


Рисунок 17. Количество IL-2- и IFN $\gamma$ -продуцирующих Т-лимфоцитов в каждой группе опытных животных после каждой иммунизации ( $P \leq 0,05$ ). А) – количество IL-2-продуцирующих CD4+ Т-лимфоцитов; Б) – количество IL-2-продуцирующих CD8+ Т-лимфоцитов; В) – количество IFN $\gamma$ -продуцирующих CD4+ Т-лимфоцитов; Г) – количество IFN $\gamma$ -продуцирующих CD8+ Т-лимфоцитов. Уровни цитокин-продуцирующих Т-лимфоцитов (в % от общего количества CD4+ или CD8+ Т-лимфоцитов) показаны на оси Y. Различные сроки забора клеточных образцов у иммунизированных животных отображены на оси X

### **3.4. Исследование формирования ВИЧ-специфических CD8+ Т-лимфоцитов у добровольцев, иммунизированных вакциной «КомбиВИЧвак»**

Для создания эффективной Т-клеточной вакцины против ВИЧ необходимо применять не только новые стратегии конструирования, но и совершенствовать методы для оценки Т-клеточного ответа. Настоящие методы для исследования Т-клеточного ответа, широко используемые в клинических испытаниях вакцин против ВИЧ, до сих пор не помогли определить параметры иммунного ответа, обеспечивающие протективность. Поэтому существует настоятельная необходимость более детального и углубленного исследования ВИЧ-специфического ответа CD8+ ЦТЛ, индуцированного вакцинацией.

Иммуногенность вакцины «КомбиВИЧвак», в том числе ДНК-компонента pcDNA-TСI, была продемонстрирована на этапе доклинических испытаний на модели мышей. Однако следует отметить, что использование мышинной модели для исследования различных аспектов иммуногенности вакцины против ВИЧ не является оптимальной из-за различий в степени связывания Т-клеточного рецептора с комплексом МНС-пептид на поверхности АПК. Иммуноген ТСI сконструирован для индукции клеточного ответа у человека и в него входят пептиды, представляемые в комплексе с наиболее распространенными человеческими HLA. В контексте создания полиэпитопных вакцин необходимо оценить презентацию выбранных эпитопов, входящих в структуру Т-клеточного иммуногена, 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.

Появление технологии пептид-МНС-мультимеров предоставляет исследователям такую возможность. С помощью этого метода удастся визуализировать ВИЧ-специфические Т-лимфоциты, определять их количество в образце и проводить их последующий анализ на уровне одной клетки. Наряду с другими методами фенотипической и функциональной оценки Т-клеток, пептид-

МНС-мультимеры могут быть использованы для исследований различных аспектов иммуногенности вакцин.

В данной работе с использованием ВИЧ-1 Env- и Gag- МНС-пентамеров и проточной цитометрии нами было проведено изучение праймирования CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в результате презентации эпитопов, закодированных в составе вакцины и формирования ВИЧ-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток у вакцинированных «КомбиВИЧвак» добровольцев в рамках I фазы клинических испытаний.

### **3.4.1. Описание вакцины и клинических испытаний**

Комбинированная вакцина «КомбиВИЧвак» объединяет два полиэпитопных иммуногена: один из них – полиэпитопный белок ТВІ стимулирует образование ВИЧ-специфического гуморального ответа, другой – полиэпитопный белок ТСІ, кодируемый ДНК-вакциной (плазмида рсDNA-ТСІ), направлен на формирование ВИЧ-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (Karpenko *et al.*, 2004; 2007).

Вакцина «КомбиВИЧвак» прошла доклинические испытания, экспертизу в ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» 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 (рандомизация) 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. Препарат вакцины вводился внутримышечно в наружную поверхность верхней трети плеча, одна доза вакцины включала 50 мкг белка ТВІ и 75 мкг ДНК-вакцины рсDNA-ТСІ.

Гуморальный иммунный ответ оценивали с помощью методов иммуноблоттинга, ИФА, а также вируснейтрализации с использованием ВИЧ-псевдовирусов. Т-клеточный иммунный ответ, индуцированный в результате вакцинации, исследовали с помощью методов IFN $\gamma$  ELISpot, пептид-МНС-пентамеров и реакции бласттрансформации лимфоцитов.

Поскольку методика пептид-МНС-пентамеров была впервые использована для исследования Т-клеточного ответа в клинических испытаниях вакцин, проводимых в России, она потребовала особого внимания и отработки протокола в условиях эксперимента, поскольку на модели животных этого сделать было невозможно. На этом основании данный раздел явился отдельной исследовательской работой.

#### **3.4.2. Определение Env- и Gag-специфических CD8+ Т-лимфоцитов у HLA A\*0201-позитивных добровольцев, вакцинированных «КомбиВИЧвак»**

Использование пептид-МНС-пентамеров на основе рекомбинантных молекул МНС I класса в сочетании с флуоресцентно мечеными анти-CD8 моноклональными антителами позволяет непосредственно определять количество антиген-специфических CD8+ Т-клеток у людей при анализе иммунного ответа, индуцированного вакцинацией (Reguzova *et al.*, 2015). Данный метод обладает очень высокой точностью, специфичностью и чувствительностью, поэтому был применен для исследования динамики формирования Env- и Gag-специфических CD8+ Т-лимфоцитов у привитых добровольцев. Исследовать динамику формирования и количество ВИЧ-специфических CD4+ Т-лимфоцитов в результате вакцинации «КомбиВИЧвак» с помощью метода пептид-МНС-пентамеров не представлялось возможным из-за отсутствия коммерчески доступных пептид-МНС-пентамеров, в основе которых использованы рекомбинантные молекулы МНС II класса.

Среди коммерчески доступных пептид-МНС-мультимеров мы остановились на выборе Pro5 МНС пентамеров I класса в комплексе с пептидами ВИЧ-1 Env D1 (KLTPLCVTL aa 120-128) и Gag 17A (SLYNTVATL aa 77-85) (ProImmune, Великобритания). Особенностью этого метода является специфичность пептид-МНС-пентамерных комплексов к определенному аллелю HLA. 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 6 человек, и в группе добровольцев, вакцинированных двукратно также 6 человек.

С использованием пептид-МНС-пентамерных комплексов были обнаружены CD8+ Т-лимфоциты, специфичные к эпитопам ВИЧ-1 Env D1 (KLTPLCVTL) и Gag 17A (SLYNTVATL) (рис 18, табл. 7, 8).

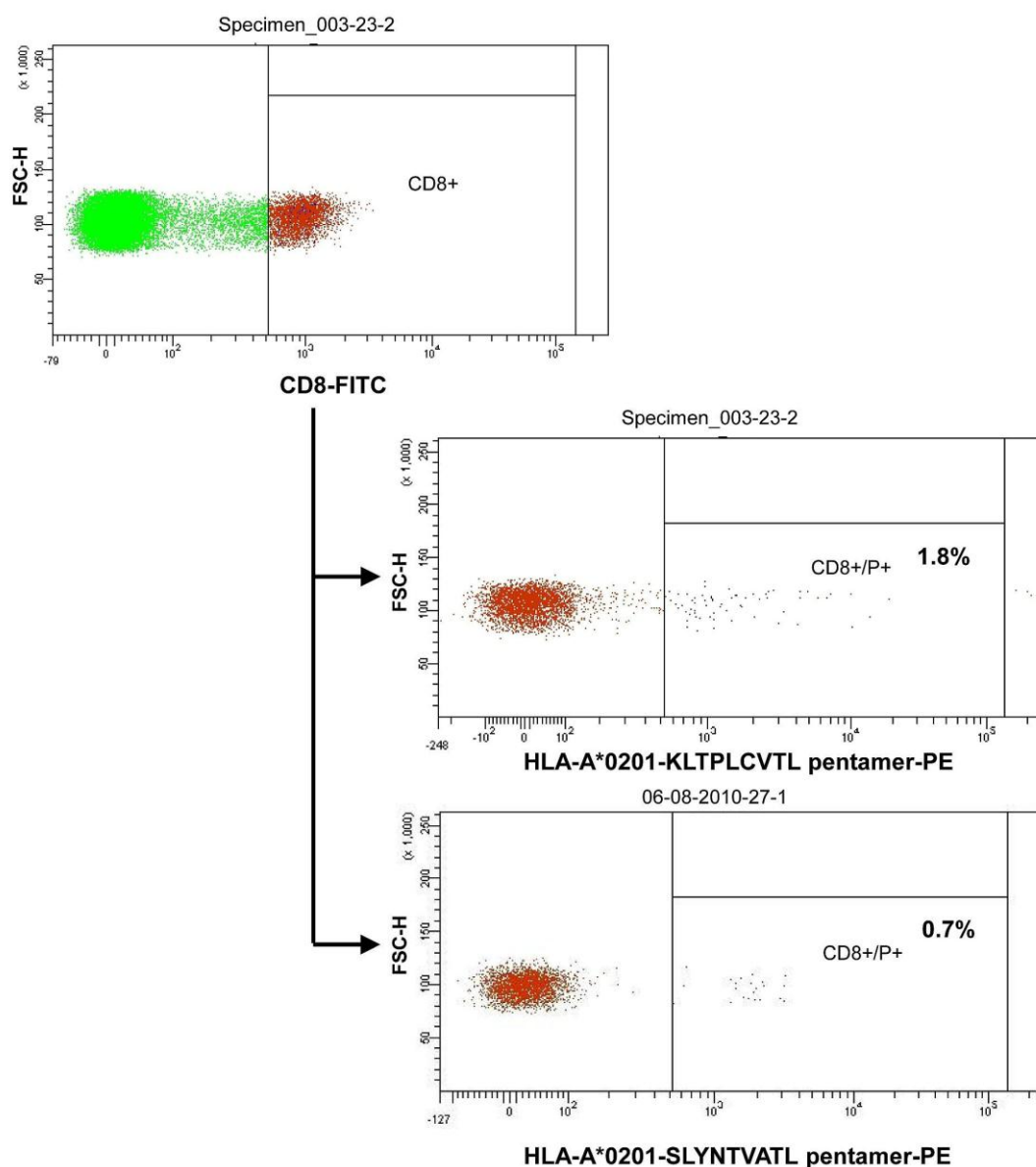


Рисунок 18. Стратегия определения Env- и Gag-специфических CD8+ Т-лимфоцитов у вакцинированных «КомбиВИЧвак» HLA A\*0201-позитивных участников I фазы клинических испытаний

Фоновый уровень пентамер-специфичных 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 двухкратной (1,7 % от числа CD8+ Т-клеток) и было достоверно выше фонового уровня до вакцинации ( $P \leq 0,01$ ) (табл. 7, 8; рис. 19, 20). На 28-й день после введения вакцины «КомбиВИЧвак», т.е. к моменту второй иммунизации, медианное значение количества Env-специфических CD8+ Т-лимфоцитов достоверно снижается ( $P \leq 0,05$ ) до 0,6 % в группе с однократной вакцинацией и до 0,75 % в группе с двукратной вакцинацией (табл. 7, 8; рис. 19, 20). При этом уровни KLTPLCVTL+ CD8+ Т-лимфоцитов на 28-й день в группах одно- и двукратно иммунизированных добровольцев достоверно не отличаются между собой, что вполне закономерно, так как к 28-му дню после первой иммунизации обе группы находились в одинаковых условиях (табл. 7, 8; рис. 19, 20).

В группе добровольцев с двукратной вакцинацией повторное введение «КомбиВИЧвак» стимулировало достоверное повышение медианного значения Env-специфических CD8+ Т-клеток через полгода после начала эксперимента по сравнению с их количеством в группе однократно вакцинированных ( $P \leq 0,01$ ). Так, в группе с двукратной вакцинацией на 6-й месяц испытаний определяется 0,5 % KLTPLCVTL+ CD8+ Т-клеток по сравнению с 0,2 % KLTPLCVTL+ CD8+ Т-лимфоцитов у участников с однократной вакцинацией (табл. 7, 8; рис. 19, 20). 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, которые, вероятно, являются Т-клетками памяти, а большая часть невостребованных CD8+ KLTPLCVTL+ Т-лимфоцитов подвергается апоптозу (табл. 7, 8).



Таблица 7

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)	Нет данных	Нет данных	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)	Нет данных	Нет данных
1/14	0 (0)	58 (1,5)	0 (0)	61 (1,0)	Нет данных	Нет данных	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

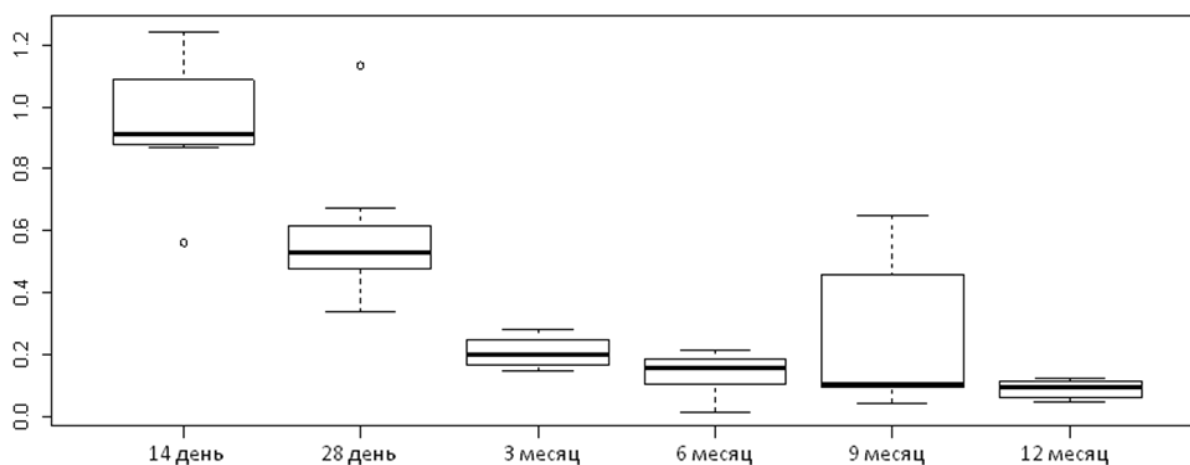


Рисунок 19. Процент KLTPLCVTL+ CD8+ Т-лимфоцитов среди всех CD8+ Т-лимфоцитов после однократной вакцинации. % KLTPLCVTL+ CD8+ Т-клеток показаны на оси Y. Сроки после иммунизации, на которые проводили замер, отображены на оси X

Gag-специфические CD8+ Т-лимфоциты были обнаружены у семи из двенадцати (58 %) вакцинированных «КомбиВИЧвак» участников на протяжении I фазы клинических испытаний. В группе с однократной вакцинацией SLYNTVATL+ CD8+ Т-клетки определяются у 3 из 6 добровольцев на уровнях, отличающихся от фонового (0,2 % – 0,5 % от числа CD8+ Т-клеток) на 6-й и 9-й

месяц испытания (табл. 7). В группе двукратно вакцинированных SLYNTVATL+ CD8+ Т-лимфоциты определяются в количестве 0,2 % у 1 из 6 добровольцев на 28-й день от начала клинических испытаний (табл. 7, 8).

Таблица 8

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)	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
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

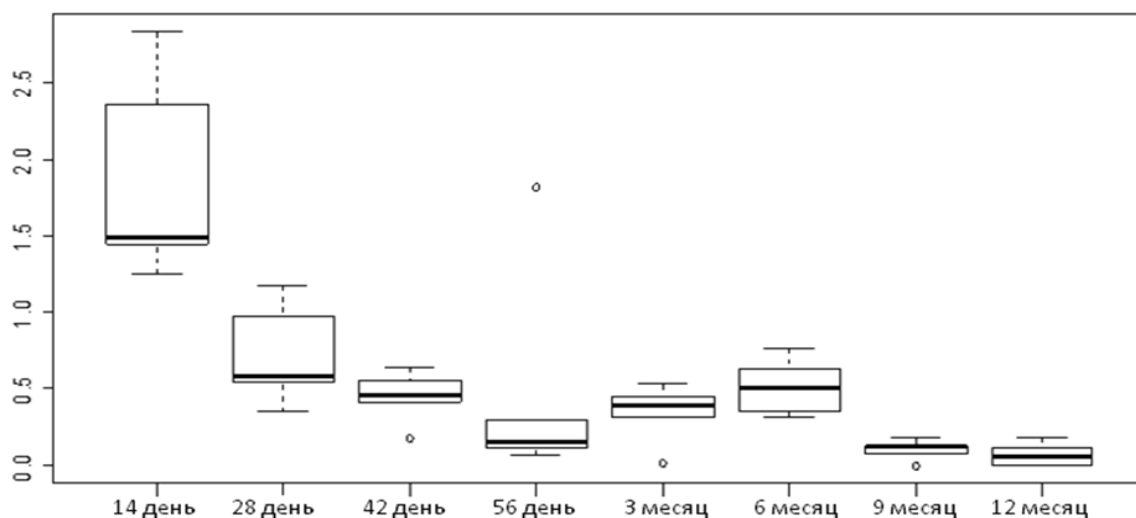


Рисунок 20. Процент KLTPLCVTL+ CD8+ Т-лимфоцитов среди всех CD8+ Т-лимфоцитов после двукратной иммунизации. % KLTPLCVTL+ CD8+ Т-клеток показаны на оси Y. Сроки после иммунизации, на которые проводили замер, отображены на оси X

Вторая иммунизация «КомбиВИЧвак» стимулировала образование Gag-специфических CD8+ Т-лимфоцитов на уровнях, отличающихся от фонового, у 2 из 6 добровольцев (33,4 %) на 28-й день после повторного введения вакцины (табл. 7). Так, у одного из участников испытаний уровень SLYNTVATL+ CD8+ Т-лимфоцитов составил 1,4 % от общего числа CD8+ Т-клеток и сохранился на уровне 0,5 % на протяжении 6 месяцев после начала эксперимента (табл. 8). В последующем SLYNTVATL+ CD8+ Т-лимфоциты определяются у 1 из добровольцев в группе с двукратной вакцинацией на 3-й месяц (0,3 %), 2 добровольцев из этой же группы на 6-й месяц (0,1 % и 0,5 %), и у 1 – на 9-й месяц (0,2 %) от начала клинических исследований (табл. 8).

Через год от начала эксперимента SLYNTVATL+ CD8+ Т-лимфоциты не обнаружены у участников в обеих группах, вакцинированных «КомбиВИЧвак» (табл. 7, 8).

Таким образом, с использованием МНС пентамеров I класса с пептидами ВИЧ-1 Env D1 и Gag 17A было показано, что полиэпитопный Т-клеточный иммуноген TCI в составе вакцины «КомбиВИЧвак» индуцирует формирование KLTPLCVTL+ CD8+ Т-лимфоцитов у 100 % добровольцев и SLYNTVATL+ CD8+ Т-лимфоцитов у 58 % добровольцев как в группе однократно, так и группе двукратно вакцинированных участников на протяжении I фазы клинических испытаний. Данный факт косвенно свидетельствует о том, что выбранные CD8+ Т-клеточные эпитопы в составе искусственного иммуногена TCI проходят правильный процессинг и презентацию CD8+ Т-лимфоцитам, подтверждая тем самым способность полиэпитопной Т-клеточной вакцины формировать ВИЧ-специфические CD8+ Т-клетки. Согласно литературным данным, праймирование наивных CD8+ Т-клеток вирусными пептидами, кодируемыми в вакцине, приводит к активации, клональной экспансии и дифференцировке CD8+ Т-лимфоцитов, в результате чего могут формироваться различные субпопуляции, такие как короткоживущие эффекторные клетки и клетки памяти (Stemberger *et al.*, 2007). Активированные встречей с антигеном CD8+ Т-клетки приобретают эффекторные функции, такие как цитотоксичность и продукция цитокинов (Williams *et al.*, 2006). Env- и Gag-специфические CD8+ Т-лимфоциты, обнаруженные у вакцинированных «КомбиВИЧвак» добровольцев

с помощью метода пептид-МНС-пентамеров, являются функционально активными, что подтверждается продукцией  $IFN\gamma$  в ответ на их стимуляцию ВИЧ-специфическими пептидами в ELISpot (данные, полученные Каплиной О.Н. в рамках I фазы клинических испытаний вакцины «КомбиВИЧвак»).

## Заключение

Вакцинация остается одним из самых эффективных методов профилактики инфекционных заболеваний и тем самым демонстрирует наиболее значимый вклад иммунологии в сохранение здоровья человека (Plotkin and Plotkin, 2008; Siegrist, 2008). Для высоковариабельных вирусов, к которым относится ВИЧ-1, невозможно использовать традиционные методы формирования патоген-специфического протективного иммунитета и применять в качестве вакцины целые инактивированные или ослабленные вирусы, либо отдельные вирусные белки, традиционно применяемые в случае других вирусных инфекций (корь, краснуха, ветряная оспа и др.). В связи с появлением современных методов иммунологии и биоинформатики стало возможным выбирать или предсказывать в составе разных вирусных белков консервативные, иммунологически значимые, лишенные иммунопатогенных свойств антигенные детерминанты, и использовать их для конструирования искусственных полиэпитопных вирусных белков в качестве компонентов вакцин нового поколения. В этой связи перспективным направлением в борьбе с ВИЧ-инфекцией является создание искусственных полиэпитопных иммуногенов, которые стимулируют клеточный иммунный ответ, ограничивающий прогрессирование заболевания и трансмиссию инфекции.

В данной работе исследовалась роль влияния оптимизации структуры полиэпитопного иммуногена на уровень индуцируемого антиген-специфического Т-клеточного иммунного ответа. Для этого при дизайне иммуногенов учитывались такие факторы как эффективность протеасомного/иммунопротеасомного процессинга и взаимодействие пептидов с ТАР. Все эпитопы фланкировались последовательностями, оптимизирующими процессинг полиэпитопной конструкции и презентацию освободившихся пептидов. Кроме того, исследовался вклад дополнительных сигнальных последовательностей, обеспечивающих процессинг и представление антигенов по пути МНС I и МНС II классов, на величину индуцируемого ВИЧ-специфического ответа CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

Ранее в независимых исследованиях было показано, что N-концевой убиквитин или C-концевой тирозиновый мотив LAMP-1 увеличивают ответы

CD4+ или CD8+ Т-лимфоцитов путем нацеливания ДНК-вакцинных конструкций либо на лизосому, либо на протеасому (Rodriguez *et al.*, 1997; 2001; Bazhan *et al.*, 2010; Starodubova *et al.*, 2014). В данной работе была поставлена задача сравнить в одних условиях возможные стратегии повышения иммуногенности ДНК-вакцинных конструкций (ответа CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов), включая оптимизацию структуры Т-клеточного иммуногена и использование дополнительных сигнальных последовательностей (N-концевого убиквитина, N-концевой сигнальной последовательности белка E3/gp19K аденовирусов в комбинации с С-концевым тирозиновым мотивом LAMP-1), обеспечивающих процессинг и представление антигенов по пути МНС I и МНС II класса.

В соответствии с предложенными стратегиями с использованием программного обеспечения TEpredict и PolyCTLDesigner был проведен дизайн, конструирование и биологическое тестирование трех полиэпитопных Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов – TCI-N (polyE), TCI-N2 (ER-signal\_polyE\_LAMP-1) и TCI-N3 (Ub\_polyE). Сконструированы рекомбинантные плазмиды, кодирующие спроектированные иммуногены, и продемонстрирована экспрессия целевых генов *in vitro*.

Полученные в ходе иммунологических исследований результаты показали, что оптимизации структуры искусственной полиэпитопной конструкции polyE недостаточно, чтобы обеспечить высокий уровень ответа CD8+ Т-лимфоцитов. Чтобы повысить иммуногенность полиэпитопной конструкции, необходимо направить иммуноген для деградации (процессинга) либо в лизосому, либо в протеасому. При сравнении этих двух подходов полученные результаты позволяют сделать вывод, что убиквитин-зависимое нацеливание полиэпитопного белка на протеасому, является более 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 высвобождаться 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.

Кроме того мы показали, что иммуноген TCI-N3, содержащий N-концевой убиквитин, после трехкратной иммунизации оказался также более эффективным в отношении индукции ряда параметров ВИЧ-специфического ответа CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов по сравнению с неоптимизированным иммуногеном TCI ( $P \leq 0,05$ ), который использовался в качестве положительного контроля.

Таким образом, полученные результаты являются важным свидетельством в пользу перспективности рационального дизайна полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов и могут быть в дальнейшем применены для разработки эффективной вакцины против ВИЧ. Использованные в работе подходы по оптимизации структуры полиэпитопных иммуногенов, направленные на повышение экспрессии, процессинга и представления иммунной системе Т-клеточных эпитопов, способны повысить уровни ВИЧ-специфического CD4+ и CD8+ Т-клеточного ответа.

Вторая часть работы посвящена расширению арсенала методов, используемых для оценки Т-клеточного ответа, индуцированного вакцинацией. В частности, современный метод пептид-МНС-пентамеров позволяет определять количество ВИЧ-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов с высокой чувствительностью и специфичностью. До сих пор этот метод не использовался для исследования Т-клеточного ответа в клинических испытаниях вакцин, проводимых в России.

Данный метод был опробирован и адаптирован в ходе I фазы клинических испытаний вакцины «КомбиВИЧвак». С помощью МНС пентамеров I класса с пептидами ВИЧ-1 Env D1 и Gag 17A мы показали присутствие ВИЧ-1 Env- и Gag-специфических CD8+ Т-лимфоцитов в крови иммунизированных добровольцев на разных сроках исследования. Учитывая, что эпитопы белков Env (KLTPLCVTL) и Gag (SLYNTVATL) ВИЧ-1 входят в состав ДНК-вакцины pcDNA-TCI (компонент вакцины «КомбиВИЧвак»), полученные результаты свидетельствует о том, что у вакцинированных добровольцев TCI иммуноген

проходит все стадии представления антигена иммунной системе, включая процессинг продукта экспрессии целевого гена и презентацию освободившихся эпитопов Т-лимфоцитам.

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



4. Выявлено, что ДНК-вакцинная конструкция, кодирующая иммуноген TCI-N3, содержащий N-концевой убиквитин, индуцирует наиболее высокие статистически значимые ( $P \leq 0,05$ ) уровни  $\text{IFN}\gamma$ - и IL-2-продуцирующих  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$ -Т-лимфоцитов после трехкратной иммунизации по сравнению с конструкциями, кодирующими иммуногены TCI-N и TCI-N2.
5. С помощью пептид-МНС-пентамеров в рамках I фазы клинических испытаний вакцины «КомбиВИЧвак» показано формирование Env-специфических (KLTPLCVTL)  $\text{CD8}^+$  Т-лимфоцитов у 100 % и Gag-специфических (SLYNTVATL)  $\text{CD8}^+$  Т-лимфоцитов у 50 % HLA-A\*0201-позитивных добровольцев.

### Список использованной литературы

1. Бажан С.И., Белавин П.А., Серегин С.В., Данилюк Н.К., Бабкина И.Н., Карпенко Л.И., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Игнатьев Г.М., Агафонов А.П., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С. Конструирование искусственного иммуногена, кандидата ДНК-вакцины, кодирующей множественные CTL-эпитопы ВИЧ-1 // ДАН. – 2004. – Т. 395 – № 6. – С. 825–827.
2. Бажан С.И., Карпенко Л.И., Ужаченко Р.В., Ильичев А.А. Новые направления конструирования вакцин против ВИЧ-1 // Биопрепараты. – 2007. – № 1. – С. 29–31.
3. Гудима Г.О., Николаева И.А., Коробова СВ., Горностаева Ю.А., Клименко Т.В., Шевалье А.Ф., Сеславина Л.С., Трубченинова Л.П., Трефилева Н.Ф., Горбунова З.А, Ищенко М.Е., Петрова Т.В., Трофимов Д.Ю., Пинегин Б.В., Черноусов А.Д., Ильина Н.И., Латышева Т.В., Алексеев Л.П., Карамов Э.В., Сидорович И.Г. Первые клинические испытания анти-ВИЧ/СПИД-вакцин в Российской Федерации: формирование когорт добровольцев // Российский Аллергологический Журнал. – 2007. – № 3. – пр.1 – С. 320–321.
4. Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Игнатьев Г.М., Агафонов А.П., Белавин П.А., Серегин С.С., Данилюк Н.К., Бажан С.И. Использование различных систем доставки ВИЧ-1 ДНК-вакцины, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген // Вестник РАМН. – 2005. – № 1. – С. 41–44.
5. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Ерошкин А.М., Лебедев Л.Р., Ужаченко Р.В., Некрасова Н.А., Плясунова О.А., Белавин П.А., Серегин С.В., Данилюк Н.К., Даниленко Е.Д., Зайцев Б.Н., Масычева В.И., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С. Вакцина «КомбиВИЧвак», содержащая полиэпитопные В- и Т-клеточные иммуногены ВИЧ-1 // Доклады Академии наук РАН (раздел «Биохимия, биофизика, молекулярная биология»). – 2007. – Т. 413. – № 4. – С. 553–556.
6. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Игнатьев Г.М., Лебедев Л.Р., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С. Искусственные анти-ВИЧ иммуногены и способы их доставки // Вестник РАМН. – 2003. – № 1. – С. 24–30.
7. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Ужаченко Р.В., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Агафонов А.П., Веремейко Т.А., Левагина Г.М., Даниленко Е.Д., Масычева В.И., Богрянцева М.П., Плясунова О.А., Ильичев А.А. Различные формы кандидатных вакцин против ВИЧ-1, несущих полиэпитопные иммуногены // Биопрепараты. – 2006. – № 4. – С. 8–11.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. М.: Молекулярное клонирование, 1984. 477 с.
9. Мурашев Б.В., Казеннова Е.В., Козлов А.А., Мурашева И.В., Духовлинова Е.Н., Галачьянц Ю.П., Дорофеева Е.С., Духовлинов И.В., Машарский А.Э., Климов Н.А. Конструирование, очистка и иммунологические свойства

- кандидатной ДНК–вакцины против ВИЧ-1 // Русский журнал "СПИД, рак и общественное здоровье". – 2007. – Т. 11. – № 1. – С. 90.
10. Покровский В.В., Н.Н. Ладная, Е.В. Соколова, Е.В. Буравцова. ВИЧ-инфекция. Информационный бюллетень №38. Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом. М., <http://hivrussia.ru>, 2013. 53 с.
  11. Романович А.Э., Козлов А.П. Методические подходы для оценки иммуногенности вакцины против ВИЧ-1 // Русский журнал «ВИЧ/СПИД и родственные проблемы». – 2001. – № 1. – С. 90–94.
  12. Aagaard C., Hoang T., Dietrich J., Cardona P.J., Izzo A., Dolganov G., Schoolnik GK, Cassidy JP, Billeskov R, Andersen P. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure // *Nat. Med.* – 2011. – V. 17. – N. 2. – P. 189–194.
  13. Acierno P.M., Schmitz J.E., Gorgone D.A., Sun Y., Santra S., Seaman M.S., Newberg M.H., Mascola J.R., Nabel G.J., Panicali D., Letvin N.L. Preservation of functional virus-specific memory CD8+ T lymphocytes in vaccinated, simian human immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys // *J. Immunol.* – 2006. – V. 17. – N. 9. – P. 5338–5345.
  14. Adis International Ltd. HIV gp120 vaccine - VaxGen: AIDSVAX, AIDSVAX B/B, AIDSVAX B/E, HIV gp120 vaccine - Genentech, HIV gp120 vaccine AIDSVAX - VaxGen, HIV vaccine AIDSVAX – VaxGen // *Drugs R D.* – 2003. – V. 4. – N. 4. – P. 249–253.
  15. Afolabi M.O., Ndure J., Drammeh A., Darboe F., Mehedi S.R., Rowland-Jones S.L., Borthwick N., Black A., Ambler G., John-Stewart G.C., Reilly M., Hanke T., Flanagan K.L. A Phase I Randomized Clinical Trial of Candidate Human Immunodeficiency Virus type 1 Vaccine MVA.HIVA Administered to Gambian Infants // *PLOS ONE.* – 2013. – V. 8. – P. e78289.
  16. Ahlborg N., Axelsson B. Dual- and triple-color fluorospot // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – V. 792. – P. 77–85.
  17. Ahlers J.D., Belyakov J.D., Belyakov I.M. Lessons learned from natural infection: focusing on the design of protective T cell vaccines for HIV/AIDS // *Trends Immunol.* – 2010. – V. 31. – P. 120–130.
  18. Ahlers J.D., Belyakov J.D., Belyakov I.M. Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T-cell memory // *Blood.* – 2010. – V. 115. – N. 9. – P. 1678–1689.
  19. Ahlers J.D., Belyakov J.D., Belyakov I.M. New paradigms for generating effective CD8+ T cell responses against HIV-1/AIDS // *Discov. Med.* – 2010. – V. 9. – N. 49. – P. 528–537.
  20. Ahlers J.D., Belyakov J.D., Dunlop N., Alling D.W., Nara P.L., Berzofsky J.A. Cytokine-in-adjuvant steering of the immune response phenotype to HIV-1 vaccine constructs: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and TNF-alpha

- synergize with IL-12 to enhance induction of cytotoxic T lymphocytes // *J. Immunol.* – 1997. – V. 158. – N. 8. – P. 3947–3958.
21. Akinsiku O.T., Bansal A., Sabbaj S., Heath S.L., Goepfert P.A. Interleukin-2 production by polyfunctional HIV-1-specific CD8 T cells is associated with enhanced viral suppression // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 2011. – V. 58. – N. 2. – P. 132–140.
  22. Alpert M.D., Harvey J.D., Lauer W.A., Reeves R.K., Piatak Jr. M., Carville A., Mansfield K.G., Lifson J.D., Li W., Desrosiers R.C., Johnson R.P., Evans D.T. ADCC develops over time during persistent infection with live-attenuated SIV and is associated with complete protection against SIV(mac)251 challenge // *PLoS Pathog.* – 2012. – V. 8. – N. 8. – P. e1002890.
  23. Altman J.D. Flow cytometry applications of MHC tetramers // *Methods Cell Biol.* – 2004. – V. 75. – P. 433–452.
  24. Altman J.D., Moss P.A., Goulder P.J., Barouch D.H., McHeyzer-Williams M.G., Bell J.I., McMichael A.J., Davis M.M. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes // *Science.* – 1996. – V. 274. – N. 5284. – P. 94–96.
  25. Amanna I.J., Slifka M.K. Contributions of humoral and cellular immunity to vaccine-induced protection in humans // *Virology.* – 2011. – V. 411. – N. 2. – P. 206–215.
  26. Amara R.R., Villinger F., Altman J.D., Lydy S.L., O'Neil S.P., Staprans S.I., Montefiori D.C., Xu Y., Herndon J.G., Wyatt L.S., Candido M.A., Kozyr N.L., Earl P.L., Smith J.M., Ma H.L., Grimm B.D., Hulsey M.L., McClure H.M., McNicholl J.M., Moss B., Robinson H.L. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine // *Vaccine.* – 2002. – V. 20. – N. 15. – P. 1949–1955.
  27. Anton L.C., Yewdell J.W., Bennink J.R. MHC class I-associated peptides produced from endogenous gene products with vastly different efficiencies // *J. Immunol.* – 1997. – V. 158. – N. 6. – P. 2535–2542.
  28. Antonets D.V., Bazhan S.I. PolyCTLDesigner: A computational tool for constructing polyepitope T-cell antigens // *BMC Res Notes.* – 2013. – V. 6. – P. 407.
  29. Antonets D.V., Maksyutov A.Z. TEpredict: Software for T-Cell epitope prediction // *Molecular Biology.* – 2010. – V. 44. – P. 119–127.
  30. Appay V., Nixon D.F., Donahoe S.M., Gillespie G.M., Dong T., King A., Ogg G.S., Spiegel H.M., Conlon C., Spina C.A., Havlir D.V., Richman D.D., Waters A., Easterbrook P., McMichael A.J., Rowland-Jones S.L. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function // *J. Exp. Med.* – 2000. – V. 192. – N. 1. – P. 63–75.
  31. Ashton-Rickardt P.G. The role of peptide in the positive selection of CD8+ T cells in the thymus // *Thymus.* – 1993. – V. 22. – N. 2. – P. 111–115.

32. Ashton-Rickardt P.G., Van Kaer L., Schumacher T.N., Ploegh H.L., Tonegawa S. Peptide contributes to the specificity of positive selection of CD8<sup>+</sup> T cells in the thymus // *Cell*. – 1993. – V. 73. – N. 5. – P. 1041–1049.
33. Barouch D.H. Novel adenovirus vector-based vaccines for HIV-1 // *Curr. Opin. HIV AIDS*. – 2010. – V. 5. – N. 5. – P. 386–390.
34. Barouch D.H., Craiu A., Kuroda M.J., Schmitz J.E., Zheng X.X., Santra S., Frost J.D., Krivulka G.R., Lifton M.A., Crabbs C.L., Heidecker G., Perry H.C., Davies M.E., Xie H., Nickerson C.E., Steenbeke T.D., Lord C.I., Montefiori D.C., Strom T.B., Shiver J.W., Lewis M.G., Letvin N.L. Augmentation of immune responses to HIV-1 and simian immunodeficiency virus DNA vaccines by IL-2/Ig plasmid administration in rhesus monkeys // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2000. – V. 97. – N. 8. – P. 4192–4197.
35. Barouch D.H., Liu J., Li H., Maxfield L.F., Abbink P., Lynch D.M., Iampietro M.J., SanMiguel A., Seaman M.S., Ferrari G., Forthal D.N., Ourmanov I., Hirsch V.M., Carville A., Mansfield K.G., Stablein D., Pau M.G., Schuitemaker H., Sadoff J.C., Billings E.A., Rao M., Robb M.L., Kim J.H., Marovich M.A., Goudsmit J., Michael N.L. Vaccine protection against acquisition of neutralization-resistant SIV challenges in rhesus monkeys // *Nature*. – 2012. – V. 482. – N. 7383. – P. 89–93.
36. Barouch D.H., Santra S., Steenbeke T.D., Zheng X.X., Perry H.C., Davies M.E., Freed D.C., Craiu A., Strom T.B., Shiver J.W., Letvin N.L. Augmentation and suppression of immune responses to an HIV-1 DNA vaccine by plasmid cytokine/Ig administration // *J. Immunol.* – 1998. – V. 161. – N. 4. – P. 1875–1882.
37. Barouch D.H., Yang Z.Y., Kong W.P., Koriath-Schmitz B., Sumida S.M., Truitt D.M., Kishko M.G., Arthur J.C., Miura A., Mascola J.R., Letvin N.L., Nabel G.J. A human T-cell leukemia virus type 1 regulatory element enhances the immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 DNA vaccines in mice and nonhuman primates // *J. Virol.* – 2005. – V. 79. – N. 14. – P. 8828–8834.
38. Barry M., Bleackley R.C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – V. 2. – N. 6. – P. 401–409.
39. Bauer R., Scheiblhofer S., Kern K., Gruber C., Stepanoska T., Thalhamer T., Hauser-Kronberger C., Alinger B., Zoegg T., Gabler M., Ferreira F., Hartl A., Thalhamer J., Weiss R. Generation of hypoallergenic DNA vaccines by forced ubiquitination: preventive and therapeutic effects in a mouse model of allergy // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2006. – V. 118. – N. 1. – P. 269–276.
40. Bazhan S.I., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Babkina I.N., Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Lebedev L.R., Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Poryvaeva V.A., Aborneva I.V., Ilyichev A.A. Designing and engineering of DNA-vaccine construction encoding multiple CTL-epitopes of major HIV-1 antigens // *Vaccine*. – 2004. – V. 22. – N. 13–14. – P. 1672–1682.
41. 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 // *Mol. Immunol.* – 2010. – V. 47. – N. 7–8. – P. 1507–1515.
42. Bazhan S.I., Karpenko L.I., Lebedev L.R., Uzhachenko R.V., Belavin P.A., Eroshkin A.M., Ilyichev A.A. A synergistic effect of a combined bivalent DNA-protein anti-HIV-1 vaccine containing multiple T- and B-cell epitopes of HIV-1 proteins // *Mol. Immunol.* – 2008. – V. 45. – N. 3. – P. 661–669.
  43. Belyakov I.M., Ahlers J.D., Belyakov J.D. Mucosal immunity and HIV-1 infection: applications for mucosal AIDS vaccine development // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2012. – V. 354. – P. 157–179.
  44. Belyakov I.M., Berzofsky J.A. Immunobiology of mucosal HIV infection and the basis for development of a new generation of mucosal AIDS vaccines // *Immunity.* – 2004. – V. 20. – N. 3. – P. 247–253.
  45. Belyakov I.M., Derby M.A., Ahlers J.D., Belyakov J.D., Kelsall B.L., Earl P., Moss B., Strober W., Berzofsky J.A. Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1998. – V. 95. – N. 4. – P. 1709–1714.
  46. Belyakov I.M., Isakov D., Zhu Q., Dzutsev A., Berzofsky J.A. A novel functional CTL avidity/activity compartmentalization to the site of mucosal immunization contributes to protection of macaques against simian/human immunodeficiency viral depletion of mucosal CD4(+) T cells // *J. Immunol.* – 2007. – V. 178. – N. 11. – P. 7211–7221.
  47. Belyakov I.M., Kuznetsov V.A., Kelsall B., Klinman D., Moniuszko M., Lemon M., Markham P.D., Pal R., Clements J.D., Lewis M.G., Strober W., Franchini G., Berzofsky J.A. Impact of vaccine-induced mucosal high-avidity CD8(+) CTLs in delay of AIDS viral dissemination from mucosa // *Blood.* – 2006. – V. 107. – N. 8. – P. 3258–3264.
  48. Belyakov I.M., Wang J., Koka R., Ahlers J.D., Belyakov J.D., Snyder J.T., Tse R., Cox J., Gibbs J.S., Margulies D.H., Berzofsky J.A. Activating CTL precursors to reveal CTL function without skewing the repertoire by in vitro expansion // *Eur. J. Immunol.* – 2001. – V. 31. – N. 12. – P. 3557–3566.
  49. Belyakov I.M., Wyatt L.S., Ahlers J.D., Belyakov J.D., Earl P., Pendleton C.D., Kelsall B.L., Strober W., Moss B., Berzofsky J.A. Induction of a mucosal cytotoxic T-lymphocyte response by intrarectal immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus expressing human immunodeficiency virus 89.6 envelope protein // *J. Virol.* – 1998. – V. 72. – N. 10. – P. 8264–8272.
  50. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate - A practical and powerful approach to multiple testing // *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological.* – 1995. – V. 57. – P. 289–300.

51. Berzofsky J., Ahlers J.D., Belyakov J., Belyakov I. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines // *Nat. Rev. Immunol.* – 2001. – V. 1. – N. 3. – P. 209–219.
52. Betts M.R., Ambrozak D.R., Douek D.C., Bonhoeffer S., Brenchley J.M., Casazza J.P., Koup R.A., Picker L.J. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses: Relationship to viral load in untreated HIV infection // *J. Virol.* – 2001. – V. 75. – N. 24. – P. 11983–11991.
53. Betts M.R., Brenchley J.M., Price D.A., De Rosa S.C., Douek D.C., Roederer M., Koup R.A. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells by a flow cytometric assay for degranulation // *J. Immunol. Methods.* – 2003. – V. 281. – N. 1–2. – P. 65–78.
54. Betts M.R., Nason M.C., West S.M., De Rosa S.C., Migueles S.A., Abraham J., Lederman M.M., Benito J.M., Goepfert P.A., Connors M., Roederer M., Koup R.A. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells // *Blood.* – 2006. – V. 107. – N. 12. – P. 4781–4789.
55. Bomert M., Köllisch G., Roponen M., Lauener R., Renz H., Pfefferle P.I., Al-Fakhri N. Analytical performance of a multiplexed, bead-based cytokine detection system in small volume samples // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2011. – V. 49. – N. 10. – P. 1691–1693.
56. Boniface J.J., Rabinowitz J.D., Wulfig C., Hampl J., Reich Z., Altman J.D., Kantor R.M., Beeson C., McConnell H.M., Davis M.M. Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands // *Immunity.* – 1998. – V. 9. – N. 4. – P. 459–466.
57. Borrow P., Lewicki H., Hahn B.H., Shaw G.M., Oldstone M.B. Virus-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection // *J. Virol.* – 1994. – V. 68. – N. 9. – P. 6103–6110.
58. Borthwick N., Ahmed T., Ondondo B., Hayes P., Rose A., Ebrahimsa U., Hayton E.J., Black A., Bridgeman A., Rosario M., Hill A.V., Berrie E., Moyle S., Frahm N., Cox J., Colloca S., Nicosia A., Gilmour J., McMichael A.J., Dorrell L., Hanke T. Vaccine-elicited human T cells recognizing conserved protein regions inhibit HIV-1 // *Mol. Ther.* – 2014. – V. 22. – N. 2. – P. 464–475.
59. Bousso P. Generation of MHC-peptide tetramers: a new opportunity for dissecting T-cell immune responses // *Microbes Infect.* – 2000. – V. 2. – N. 4. – P. 425–429.
60. Boyer J.D., Robinson T.M., Kutzler M.A., Parkinson R., Calarota S.A., Sidhu M.K., Muthumani K., Lewis M., Pavlakis G., Felber B., Weiner D. SIV DNA vaccine co-administered with IL-12 expression plasmid enhances CD8 SIV cellular immune responses in cynomolgus macaques // *J. Med. Primatol.* – 2005. – V. 34. – N. 5–6. – P. 262–270.
61. Brunner K.T., Mauel J., Cerottini J.C., Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro;

- inhibition by isoantibody and by drugs // *Immunology*. – 1968. – V. 14. – N. 2. – P. 181–196.
62. Burgers W.A., Chege G.K., Muller T.L., van Harmelen J.H., Khoury G., Shephard E.G., Gray C.M., Williamson C., Williamson A.L. Broad, high-magnitude and multifunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses elicited by a DNA and modified vaccinia Ankara vaccine containing human immunodeficiency virus type 1 subtype C genes in baboons // *J. Gen. Virol.* – 2009. – V. 90 (Pt 2). – P. 468–480.
  63. Cai Y., Rodriguez S., Hebel H. DNA vaccine manufacture: scale and quality // *Expert Rev. Vaccines*. – 2009. – V. 8. – N. 9. – P. 1277–1291.
  64. Cardinaud S., Bouziat R., Rohrlisch P.S., Tourdot S., Weiss L., Langlade-Demoyen P., Burgevin A., Fiorentino S., van Endert P., Lemonnier F.A. Design of a HIV-1-derived HLA-B07.02-restricted polyepitope construct // *AIDS*. – 2009. – V. 23. – N. 15. – P. 1945–1954.
  65. Carson R.T., Desai D.D., Vignali K.M., Vignali D.A. Immunoregulation of Th cells by naturally processed peptide antagonists // *J. Immunol.* – 1999. – V. 162. – N. 1. – P. 1–4.
  66. Casimiro D.R., Wang F., Schleif W.A., Liang X., Zhang Z.Q., Tobery T.W., Davies M.E., McDermott A.B., O'Connor D.H., Fridman A., Bagchi A., Tussey L.G., Bett A.J., Finnefrock A.C., Fu T.M., Tang A., Wilson K.A., Chen M., Perry H.C., Heidecker G.J., Freed D.C., Carella A., Punt K.S., Sykes K.J., Huang L., Ausensi V.I., Bachinsky M., Sadasivan-Nair U., Watkins D.I., Emini E.A., Shiver J.W. Attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection by prophylactic immunization with DNA and recombinant adenoviral vaccine vectors expressing Gag // *J. Virol.* – 2005. – V. 79. – N. 24. – P. 15547–15555.
  67. Cassataro J., Velikovsky C.A., de la Barrera S., Estein S.M., Bruno L., Bowden R., Pasquevich K.A., Fossati C.A., Giambartolomei G.H. A DNA vaccine coding for the Brucella outer membrane protein 31 confers protection against B. melitensis and B. ovis infection by eliciting a specific cytotoxic response // *Infect. Immun.* – 2005. – V. 73. – N. 10. – P. 6537–6546.
  68. Castellino F., Germain R.N. Cooperation between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells: when, where, and how // *Annu. Rev. Immunol.* – 2006. – V. 24. – P. 519–540.
  69. Ceberé I., Dorrell L., McShane H., Simmons A., McCormack S., Schmidt C., Smith C., Brooks M., Roberts J.E., Darwin S.C., Fast P.E., Conlon C., Rowland-Jones S., McMichael A.J., Hanke T. Phase I clinical trial safety of DNA- and modified virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccines administered alone and in a prime-boost regime to healthy HIV-1-uninfected volunteers // *Vaccine*. – 2006. – V. 24. – N. 2. – P. 417–425.
  70. Chattopadhyay P.K., Betts M.R., Price D.A., Gostick E., Horton H., Roederer M., De Rosa S.C. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression // *J. Leukoc. Biol.* – 2009. – V. 85. – N. 1. – P. 88–97.



71. Chen W.S., Anton L.C., Bennink J.R., Yewdell J.W. Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses // *Immunity*. – 2000. – V. 12. – N. 1. – P. 83–93.
72. Chomont N., El-Far M., Ancuta P., Trautmann L., Procopio F.A., Yassine-Diab B., Boucher G., Boulassel M.R., Ghattas G., Brenchley J.M., Schacker T.W., Hill B.J., Douek D.C., Routy J.P., Haddad E.K., Sékaly R.P. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation // *Nat. Med.* – 2009. – V. 15. – N. 8. – P. 893–900.
73. Choo D.K., Murali-Krishna K., Anita R., Ahmed R. Homeostatic turnover of virus-specific memory CD8 T cells occurs stochastically and is independent of CD4 T cell help // *J Immunol.* – 2010. – V. 185. – N. 6. – P. 3436–3444.
74. Chowdhury F., Williams A., Johnson P. Validation and comparison of two multiplex technologies, Luminex and Mesoscale Discovery, for human cytokine profiling // *J. Immunol. Methods.* – 2009. – V. 340. – N. 1. – P. 55–64.
75. Ciernik I.F., Berzofsky J.A., Carbone D.P. Induction of cytotoxic T lymphocytes and antitumor immunity with DNA vaccines expressing single T cell epitopes // *J. Immunol.* – 1996. – V. 156. – N. 7. – P. 2369–2375.
76. Cohen J. The HIV vaccine paradox // *Science*. – 1994. – V. 264. – P. 1072–1074
77. Cohen M.S., Hellmann N., Levy J.A., DeCock K., Lange J. The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic // *J. Clin. Invest.* – 2008. – V. 118. – N. 4. – P. 1244–1254.
78. Czerkinsky C., Moldoveanu Z., Mestecky J., Nilsson L.A., Ouchterlony O. A novel two colour ELISPOT assay. I. Simultaneous detection of distinct types of antibody-secreting cells // *J. Immunol. Methods.* – 1988. – V. 115. – N. 1. – P. 31–37.
79. Dabita D., Margolick J.B., Lopez J., Bream J.H. Multiplex measurement of proinflammatory cytokines in human serum: comparison of the Meso Scale Discovery electrochemiluminescence assay and the Cytometric Bead Array // *J. Immunol. Methods.* – 2011. – V. 372. – N. 1–2. – P. 71–77.
80. Dalporto J., Johansen T.E., Catipovic B., Parfiit D.J., Tuveson D., Gether U., Kozlowski S., Fearon D.T., Schneck J.P. A soluble divalent class-I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive t-cells at nanomolar concentrations // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1993. – V. 90. – N. 14. – P. 6671–6675.
81. Darrah P.A., Patel D.T., De Luca P.M., Lindsay R.W., Davey D.F., Flynn B.J., Hoff S.T., Andersen P., Reed S.G., Morris S.L., Roederer M., Seder R.A. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major* // *Nat. Med.* – 2007. – V. 13. – N. 7. – P. 843–850.
82. Davis M.M., Altman J.D., Newell E.W. Interrogating the repertoire: broadening the scope of peptide-MHC multimer analysis // *Nat. Rev. Immunol.* – 2011. – V. 11. – N. 8. – P. 551–558.
83. Davis M.M., Bjorkman P.J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition // *Nature*. – 1988. – V. 334. – N. 6181. – P. 395–402.

84. Day P.M., Yewdell J.W., Porgador A., Germain R.N., Bennink J.R. Direct delivery of exogenous MHC class I molecule-binding oligopeptides to the endoplasmic reticulum of viable cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1997. – V. 94. – N. 15. – P. 8064–8069.
85. de Arruda L.B., Chikhlikar P.R., August J.T., Marques E.T. DNA vaccine encoding human immunodeficiency virus-1 Gag, targeted to the major histocompatibility complex II compartment by lysosomal-associated membrane protein, elicits enhanced long-term memory response // *Immunology.* – 2004. – V. 112. – N. 1. – P. 126–133.
86. De Rosa S.C. Vaccine applications of flow cytometry // *Methods.* – 2012. – V. 57. – N. 3. – P. 383–391.
87. De Rosa S.C., Lu F.X., Yu J., Perfetto S.P., Falloon J., Moser S., Evans T.G., Koup R., Miller C.J., Roederer M. Vaccination in humans generates broad T cell cytokine responses // *J. Immunol.* – 2004. – V. 173. – N. 9. – P. 5372–5380.
88. Decker T., Lohmann-Matthes M.L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity // *J. Immunol. Methods.* – 1988. – V. 115. – N. 1. – P. 61–69.
89. Defawe O.D., Fong Y., Vasilyeva E., Pickett M., Carter D.K., Gabriel E., Rerks-Ngarm S., Nitayaphan S., Frahm N., McElrath M.J., De Rosa S.C. Optimization and qualification of a multiplex bead array to assess cytokine and chemokine production by vaccine-specific cells // *J. Immunol. Methods.* – 2012. – V. 382. – N. 1–2. – P. 117–128.
90. Delogu G., Howard A., Collins F.M., Morris S.L. DNA vaccination against tuberculosis: expression of a ubiquitin-conjugated tuberculosis protein enhances antimycobacterial immunity // *Infect. Immun.* – 2000. – V. 68. – N. 6. – P. 3097–3102.
91. Dennes A., Madsen P., Nielsen M.S., Petersen C.M., Pohlmann R. The yeast vps10p cytoplasmic tail mediates lysosomal sorting in mammalian cells and interacts with human GGAs // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – N. 14. – P. 12288–12293.
92. Disis M.L., Bernhard H., Shiota F.M., Hand S.L., Gralow J.R., Huseby E.S., Gillis S., Cheever M.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines // *Blood.* – 1996. – V. 88. – N. 1. – P. 202–210.
93. Doytchinova I.A., Guan P.P., Flower D.R. Identifying human MHC supertypes using bioinformatic methods // *J. Immunol.* – 2004. – V. 172. – N. 7. – P. 4314–4323.
94. D'Souza M.P., Frahm N. Adenovirus 5 serotype vector-specific immunity and HIV-1 infection: a tale of T cells and antibodies // *AIDS.* – 2010. – V. 24. – N. 6. – P. 803–809.

95. Dunbar P.R., Ogg G.S., Chen J., Rust N., van der Bruggen P., Cerundolo V. Direct isolation, phenotyping and cloning of low-frequency antigen-specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood // *Curr. Biol.* – 1998. – V. 8. – N. 7. – P. 413–416.
96. Elshal M.F., McCoy J.P. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA // *Methods.* – 2006. – V. 38. – N. 4. – P. 317–323.
97. Eroshkin A.M., Karginova E.A., Gileva I.P., Lomakin A.S., Lebedev L.R., Kamyinina T.P., Pereboev A.V., Ignat'ev G.M. Design of four-helix bundle protein as a candidate for HIV vaccine // *Protein Eng.* – 1995. – V. 8. – N. 2. – P. 167–173.
98. Esparza J. A brief history of the global effort to develop a preventive HIV vaccine // *Vaccine.* – 2013. – V. 31. – N. 35. – P. 3502–3518.
99. Esparza J. Solid vaccine protection against SIV in rhesus monkeys provides proof-of-concept for further evaluation of a novel HIV vaccine approach in humans // *Expert Rev. Vaccines.* – 2012. – V. 11. – N. 5. – P. 539–542.
100. Esparza J., Osmanov S. HIV vaccines: a global perspective // *Curr. Mol. Med.* – 2003. – V. 3. – N. 3. – P. 183–193.
101. Esparza J., Russell N., Gayle H. The challenge of developing and evaluating preventive vaccines against HIV/AIDS. HIV Vaccine Research and Development in Thailand. Bangkok: Mahidol University, 2006. P. 3–26.
102. Evans T.G., Keefer M.C., Weinhold K.J., Wolff M., Montefiori D., Gorse G.J., Graham B.S., McElrath M.J., Clements-Mann M.L., Mulligan M.J., Fast P., Walker M.C., Excler J.L., Duliege A.M., Tartaglia J. A canarypox vaccine expressing multiple human immunodeficiency virus type 1 genes given alone or with rgp120 elicits broad and durable CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in seronegative volunteers // *J. Infect. Dis.* – 1999. – V. 180. – N. 2. – P. 290–298.
103. Ferraro B., Morrow M.P., Hutnick N.A., Shin T.H., Lucke C.E., Weiner D.B. Clinical applications of DNA vaccines: current progress // *Clin. Infect. Dis.* – 2011. – V. 53. – N. 3. – P. 296–302.
104. Figueiredo S., Charmeteau B., Surenaud M., Salmon D., Launay O., Guillet J.G., Hosmalin A., Gahery H. Memory CD8(+) T cells elicited by HIV-1 lipopeptide vaccines display similar phenotypic profiles but differences in term of magnitude and multifunctionality compared with FLU- or EBV-specific memory T cells in humans // *Vaccine.* – 2014. – V. 32. – N. 4. – P. 492–501.
105. Fischer W., Perkins S., Theiler J., Bhattacharya T., Yusim K., Funkhouser R., Kuiken C., Haynes B., Letvin N.L., Walker B.D., Hahn B.H., Korber B.T. Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants // *Nat. Med.* – 2007. – V. 13. – N. 1. – P. 100–106.
106. Flagella M., Bui S., Zheng Z., Nguyen C.T., Zhang A., Pastor L., Ma Y., Yang W., Crawford K.L., McMaster G.K., Witney F., Luo Y. A multiplex branched DNA

- assay for parallel quantitative gene expression profiling // *Anal. Biochem.* – 2006. – V. 352. – N. 1. – P. 50–60.
107. Flynn N.M., Forthal D.N., Harro C.D., Judson F.N., Mayer K.H., Para M.F., rgp120 HIV Vaccine Study Group. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection // *J. Infect. Dis.* – 2005. – V. 191. – N. 5. – P. 654–665.
  108. Freer G, Rindi L. Intracellular cytokine detection by fluorescence-activated flow cytometry: Basic principles and recent advances // *Methods.* – 2013. – V. 61. – N. 1. – P. 30–38.
  109. Fu T.M., Mylin L.M., Schell T.D., Bacik .I, Russ G., Yewdell J.W., Bennink J.R., Tevethia S.S. An endoplasmic reticulum-targeting signal sequence enhances the immunogenicity of an immunorecessive simian virus 40 large T antigen cytotoxic T-lymphocyte epitope // *J. Virol.* – 1998. – V. 72. – N. 2. – P. 1469–1481.
  110. Gao F., Li Y., Decker J.M., Peyerl F.W., Bibollet-Ruche F., Bibollet-Ruche F., Rodenburg C.M., Chen Y., Shaw D.R., Allen S., Musonda R., Shaw G.M., Zajac A.J., Letvin N., Hahn B.H. Codon usage optimization of HIV type 1 subtype C gag, pol, env, and nef genes: In vitro expression and immune responses in DNA-vaccinated mice // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* – 2003. – V. 19. – N. 9. – P. 817–823.
  111. Gazagne A., Claret E., Wijdenes J., Yssel H., Bousquet F., Levy E., Vielh P., Scotte F., Goupil T.L., Fridman W.H., Tartour E. A Fluorospot assay to detect single T lymphocytes simultaneously producing multiple cytokines // *J. Immunol. Methods.* – 2003. – V. 283. – N. 1–2. – P. 91–98.
  112. Goodell V., dela Rosa C., Slota M., MacLeod B., Disis M.L. Sensitivity and specificity of tritiated thymidine incorporation and ELISPOT assays in identifying antigen specific T cell immune responses // *BMC Immunol.* – 2007. – V. 8. – P. 21.
  113. Goonetilleke N., Moore S., Dally L., Winstone N., Cebere I., Mahmoud A., Pinheiro S., Gillespie G., Brown D., Loach V., Roberts J., Guimaraes-Walker A., Hayes P., Loughran K., Smith C., De Bont J., Verlinde C., Vooijs D., Schmidt C., Boaz M., Gilmour J., Fast P., Dorrell L., Hanke T., McMichael A.J. Induction of multifunctional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T cells capable of proliferation in healthy subjects by using a prime-boost regimen of DNA- and modified vaccinia virus Ankara-vectored vaccines expressing HIV-1 Gag coupled to CD8+ T-cell epitopes // *J. Virol.* – 2006. – V. 80. – N. 10. – P. 4717–4728.
  114. Gorelick R.J., Benveniste R.E., Lifson J.D., Yovandich J.L., Morton W.R., Kuller L., Flynn B.M., Fisher B.A., Rossio J.L., Piatak M. Jr., Bess JW. Jr., Henderson L.E., Arthur L.O. Protection of *Macaca nemestrina* from disease following pathogenic simian immunodeficiency virus (SIV) challenge: utilization of SIV nucleocapsid mutant DNA vaccines with and without an SIV protein boost // *J. Virol.* – 2000. – V. 74. – N. 24. – P. 11935–11949.

115. Gorse G.J., Baden L.R., Wecker M., Newman M.J., Ferrari G., Weinhold K.J., Livingston B.D., Villafana T.L., Li H., Noonan E., Russell N.D., HIV Vaccine Trials Network. Safety and immunogenicity of cytotoxic T-lymphocyte poly-epitope, DNA plasmid (EP HIV-1090) vaccine in healthy, human immunodeficiency virus type 1(HIV-1)-uninfected adults // *Vaccine*. – 2008. – V. 26. – N. 2. – P. 215–223.
116. Grant E.P., Michalek M.T., Goldberg A.L., Rock K.L. Rate of antigen degradation by the ubiquitin-proteasome pathway influences MHC class I presentation // *J. Immunol.* – 1995. – V. 155. – N. 8. – P. 3750–3758.
117. Gray G.E., Allen M., Moodie Z., Churchyard G., Bekker L.G., Nchabeleng M., Mlisana K., Metch B., de Bruyn G., Latka M.H., Roux S., Mathebula M., Naicker N., Ducar C., Carter D.K., Puren A., Eaton N., McElrath M.J., Robertson M., Corey L., Kublin J.G., HVTN 503/Phambili study team. Safety and efficacy of the HVTN 503/Phambili study of a clade-B-based HIV-1 vaccine in South Africa: a double-blind, randomised, placebo-controlled test-of-concept phase 2b study // *Lancet Infect. Dis.* – 2011. – V. 11. – N. 7. – P. 507–515.
118. Gudima G., Nikolaeva I., Korobova S., Gornostaeva J., Klimenko T., Chevalier A., Trubcheninova L., Trefilieva N., Gorbunova Z., Ischenko M., Petrova T., Trofimov D., Alexeev L., Pinegin B., Chernousov A., Latysheva T., Ilina N., Karamov E., Sidorovich I. Cohort formation for first clinical trials of HIV/AIDS vaccine in Russian Federation // *Antiviral therapy*. – 2007. – V. 12. – P. 131.
119. Guillaume P., Dojcinovic D., Luescher I. F. Soluble MHC-peptide complexes: tools for the monitoring of T cell responses in clinical trials and basic research // *Cancer Immun.* – 2009. – V. 9. – P. 7 – 18.
120. Gutgemann I., Fahrer A.M., Altman J.D., Davis M.M., Chien Y.H. Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen // *Immunity*. – 1998. – V. 8. – N. 6. – P. 667–673.
121. Hammer S.M., Sobieszczyk M.E., Janes H., Karuna S.T., Mulligan M.J., Grove D., Koblin B.A., Buchbinder S.P., Keefer M.C., Tomaras G.D., Frahm N., Hural J., Anude C., Graham B.S., Enama M.E., Adams E., DeJesus E., Novak R.M., Frank I., Bentley C., Ramirez S., Fu R., Koup R.A., Mascola J.R., Nabel G.J., Montefiori D.C., Kublin J., McElrath M.J., Corey L., Gilbert P.B., HVTN 505 Study Team. Efficacy Trial of a DNA/rAd5 HIV-1 Preventive Vaccine // *N Engl J Med.* – 2013. – V. 369. – N. 2. – P. 2083 – 2092.
122. Han Q., Bagheri N., Bradshaw E.M., Hafler D.A., Lauffenburger D.A., Love J.C. Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2012. – V. 109. – N. 5. – P. 1607–1612.
123. Hanke T, McMichael A.J. HIV-1: from escapism to conservatism // *Eur. J. Immunol.* – 2011. – V. 41. – N. 12. – P. 3390–3393.

124. Hanke T. Conserved immunogens in prime-boost strategies for the next-generation HIV-1 vaccines // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2014. – V. 14. – N. 5. – P. 601–616.
125. Hanke T., McMichael A.J., Dorrell L. Clinical experience with plasmid DNA- and modified vaccinia virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 clade A vaccine focusing on T-cell induction // *J. Gen. Virol.* – 2007. – V. 88 (Pt 1) – P. 1–12.
126. Harari A., Petitpierre S., Vallelian F., Pantaleo G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy // *Blood.* – 2004. – V. 103. – N. 3. – P. 966–972.
127. Haucke V. Where proteins and lipids meet: Membrane trafficking on the move // *Dev. Cell.* – 2003. – V. 4. – N. 2. – P. 153–157.
128. Hershko A., Ciechanover A. The ubiquitin system // *Annu. Rev. Biochem.* – 1998. – V. 67. – P. 425–479.
129. Hope J.C., Thom M.L., McAulay M., Mead E., Vordermeier H.M., Clifford D., Hewinson R.G., Villarreal-Ramos B. Identification of surrogates and correlates of protection in protective immunity against *Mycobacterium bovis* infection induced in neonatal calves by vaccination with *M. bovis* BCG Pasteur and *M. bovis* BCG Danish // *Clin. Vaccine. Immunol.* – 2011. – V. 18. – N. 3. – P. 373–379.
130. Hutchings P.R., Cambridge G., Tite J.P., Meager T., Cooke A. The detection and enumeration of cytokine-secreting cells in mice and man and the clinical application of these assays // *J. Immunol. Methods.* – 1989. – V. 120. – N. 1. – P. 1–8.
131. Hutnick N.A., Myles D.J., Bian C.B., Muthumani K., Weiner D.B. Selected approaches for increasing HIV DNA vaccine immunogenicity in vivo // *Curr. Opin. Virol.* – 2011. – V. 1. – N. 4. – P. 233–240.
132. Hutnick NA, Myles DJ, Ferraro B, Lucke C, Lin F, Yan J., Broderick K.E., Khan A.S., Sardesai N.Y., Weiner D.B. Intradermal DNA vaccination enhanced by low-current electroporation improves antigen expression and induces robust cellular and humoral immune responses // *Hum. Gene Ther.* – 2012. – V. 23. – N. 9. – P. 943–950.
133. Ishioka G.Y., Fikes J., Hermanson G., Livingston B., Crimi C., Qin M., del Guercio M.F., Oseroff C., Dahlberg C., Alexander J., Chesnut R.W., Sette A. Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes // *J. Immunol.* – 1999. – V. 162. – N. 7. – P. 3915–3925.
134. Jaoko W., Nakwagala F.N., Anzala O., Manyonyi G.O., Birungi J., Nanvubya A., Bashir F., Bhatt K., Ogutu H., Wakasiaka S., Matu L., Waruingi W., Odada J., Oyaro M., Indangasi J., Ndinya-Achola J., Konde C., Mugisha E., Fast P., Schmidt C., Gilmour J., Tarragona T., Smith C., Barin B., Dally L., Johnson B., Muluubya A., Nielsen L., Hayes P., Boaz M., Hughes P., Hanke T., McMichael A., Bwayo J.,

- Kaleebu P. Safety and immunogenicity of recombinant low-dosage HIV-1A vaccine candidates vectored by plasmid pTHr DNA or modified vaccinia virus Ankara (MVA) in humans in East Africa // *Vaccine*. – 2008. – V. 26. – N. 2. – P. 2788–2795.
135. Ji H., Wang T.L., Chen C.H., Pai S.I., Hung C.F., Lin K.Y., Kurman R.J., Pardoll D.M., Wu T.C. Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors // *Hum. Gene Ther.* – 1999. – V. 10. – N. 17. – P. 2727–2740.
  136. Jin X., Bauer D.E., Tuttleton S.E., Lewin S., Gettie A., Blanchard J., Irwin C.E., Safrit J.T., Mittler J., Weinberger L., Kostrikis L.G., Zhang L., Perelson A.S., Ho D.D. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques // *J. Exp. Med.* – 1999. – V. 189. – N. 6. – P. 991–998.
  137. Julg B., Williams K.L., Reddy S., Bishop K., Qi Y., Carrington M., Goulder P.J., Ndung'u T., Walker B.D. Enhanced anti-HIV functional activity associated with Gag-specific CD8 T-cell responses // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – N. 1. – P. 5540–5549.
  138. Karlsson A.C., Martin J.N., Younger S.R., Bredt B.M., Epling L., Ronquillo R., Varma A., Deeks S.G., McCune J.M., Nixon D.F., Sinclair E. Comparison of the ELISPOT and cytokine flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells // *J. Immunol. Methods*. – 2003. – V. 283. – N. 1–2. – P. 141–153.
  139. Karpenko L.I., Bazhan S.I., Antonets D.V., Belyakov I.M. Novel approaches in polyepitope T-cell vaccine development against HIV-1 // *Expert Rev. Vaccines*. – 2014. – V. 13. – N. 1. – P. 155–173.
  140. Karpenko L.I., Bazhan S.I., Eroshkin A.M., Lebedev L.R., Uzhachenko R.V., Nekrasova N.A., Plyasunova O.A., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Danilenko E.D., Zaitsev B.N., Masicheva V.I., Ilyichev A.A., Sandakhchiev L.S. CombiHIVvac vaccine which contains polyepitope B and T-cell immunogens of HIV-1 // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2007. – V. 413. – P. 65–67.
  141. Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Eroshkin A.M., Lebedev L.R., Uzhachenko R.V., Nekrasova N.A., Plyasunova O.A., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Zaitsev B.N., Danilenko E.D., Masicheva V.I., Bazhan S.I. Combined virus-like particle-based polyepitope DNA/protein HIV-1 vaccine design, immunogenicity and toxicity studies // *Vaccine*. – 2007. – V. 25. – N. 21. – P. 4312–4323.
  142. Kawada M., Tsukamoto T., Yamamoto H., Iwamoto N., Kurihara K., Takeda A., Moriya C., Takeuchi H., Akari H., Matano T. Gag-specific cytotoxic T-lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial // *J. Virol.* – 2008. – V. 82. – N. 20. – P. 10199–10206.
  143. Kiepiela P., Ngumbela K., Thobakgale C., Ramduth D., Honeyborne I., Moodley E., Reddy S., de Pierres C., Mncube Z., Mkhwanazi N., Bishop K., van der Stok M.,

- Nair K., Khan N., Crawford H., Payne R., Leslie A., Prado J., Prendergast A., Frater J., McCarthy N., Brander C., Learn G.H., Nickle D., Rousseau C., Coovadia H., Mullins J.I., Heckerman D., Walker B.D., Goulder P. CD8<sup>+</sup> T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load // *Nat. Med.* – 2007. – V. 13. – N. 1. – P. 46–53.
144. Klavinskis L.S., Gao L., Barnfield C., Lehner T., Parker S. Mucosal immunization with DNA-liposome complexes // *Vaccine.* – 1997. – V. 15. – N. 8. – P. 818–820.
  145. Klenerman P., Cerundolo V., Dunbar R.R. Tracking T cells with tetramers: New tales from new tools // *Nat. Rev. Immun.* – 2002. – V. 2. – N. 4. – P. 263–272.
  146. Klinman D.M., Yi A.K., Beaucage S.L., Conover J., Krieg A.M. CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1996. – V. 93. – N. 7. – P. 2879–2883.
  147. 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 // *J. Virol.* – 2012. – V. 86. – N. 8. – P. 4082–4090.
  148. Korber B.T., Letvin N.L., Haynes B.F. T-cell vaccine strategies for human immunodeficiency virus, the virus with a thousand faces // *J. Virol.* – 2009. – V. 83. – N. 17. – P. 8300–8314.
  149. Korobova S., Chevalier A., Nikolaeva I., Gudima G., Gornostaeva Y., Trubcheninova L., Chernousov A., Pinegin B., Karamov E., Pavlova T., Kornilaeva G., Petrova T., Trofimov D., Sidorovich I. Phase I Clinical Trials of a Candidate Vaccine Based on Fusion Recombinant Gag-gp41 Protein in Healthy HIV Negative Volunteers // *AIDS Research and Human Retroviruses.* – 2008. – V. 24. – P. 237.
  150. Korobova S., Nikolaeva I., Chevalier A., Gornostaeva Yu., Trubcheniniva L., Gorbunova Z., Goudima G., Pinegin B., Chernousov A., Petrova T., Trofimov D., Sidorovich I. Analysis of the safety and the immunogenicity of the gag-env HIV1 recombinant protein-based vaccine “VICHREPOL” in healthy adults // *Allergy.* – 2007. – V. 62. – N. 83. – P. 167–551.
  151. Korzeniewski C., Callewaert D.M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – V. 64. – N. 3. – P. 313–320.
  152. Koup R.A., Douek D.C. Vaccine Design for CD8 T Lymphocyte Responses // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2011. – V. 1. – N. 1. – P. a007252.
  153. Koup R.A., Safrit J.T., Cao Y., Andrews C.A., McLeod G., Borkowsky W., Farthing C., Ho D.D. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome // *J. Virol.* – 1994. – V. 68. – N. 7. – P. 4650–4655.



154. Kulkarni V., Rosati M., Valentin A., Ganneru B., Singh A.K., Yan J., Rolland M., Alicea C., Beach R.K., Zhang G.M., Le Gall S., Broderick K.E., Sardesai N.Y., Heckerman D., Mothe B., Brander C., Weiner D.B., Mullins J.I., Pavlakis G.N., Felber B.K. HIV-1 p24(gag) derived conserved element DNA vaccine increases the breadth of immune response in mice // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – N. 3. – P. e60245.
155. Kutzler M.A., Weiner D.B. DNA vaccines: ready for prime time? // *Nat. Rev. Genet.* – 2008. – V. 9. – N. 10. – P. 776–788.
156. Laemmly U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – V. 227. – N. 5259. – P. 680–685.
157. Lalor M.K., Floyd S., Gorak-Stolinska P., Ben-Smith A., Weir R.E., Smith S.G., Newport M.J., Blitz R., Mvula H., Branson K., McGrath N., Crampin A.C., Fine P.E., Dockrell H.M. BCG vaccination induces different cytokine profiles following infant BCG vaccination in the UK and Malawi // *J. Infect. Dis.* – 2011. – V. 204. – N. 7. – P. 1075–1085.
158. Lalvani A., Aidoo M., Allsopp C.E., Plebanski M., Whittle H.C., Hill A.V. An HLA-based approach to the design of a CTL-inducing vaccine against *Plasmodium falciparum* // *Res. Immunol.* – 1994. – V. 145. – N. 6. – P. 461–468.
159. Last'ovicka J., Budinský V., Spísek R., Bartunková J. Assessment of lymphocyte proliferation: CFSE kills dividing cells and modulates expression of activation markers // *Cell. Immunol.* – 2009. – V. 256. – N. 1–2. – P. 79–85.
160. Lebedev L.R., Karpenko L.I., Poryvaeva V.A., Azaev M.Sh., Riabchikova E.I., Gileva I.P., Il'ichev A.A. Design of virus-like particles, exposing HIV-1 epitopes // *Mol. Biol.* – 2000. – V. 34. – N. 3. – P. 480–485.
161. Lehmann P.V., Zhang W. Unique strengths of ELISPOT for T cell diagnostics // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – V. 792. – P. 3–23.
162. Leif R.C., Stein J.H., Zucker R.M. A short history of the initial application of anti-5-BrdU to the detection and measurement of S phase // *Cytometry*. – 2004. – V. 58. – N. 1. – P. 45–52.
163. Leisner C., Loeth N., Lamberth K., Justesen S., Sylvester-Hvid C., Schmidt E.G., Claesson M., Buus S., Stryhn A. One-pot, mix-and-read peptide-MHC tetramers // *PLoS One*. – 2008. – V. 3. – N. 2. – P. e1678.
164. Leitner W.W., Restifo N.P. DNA vaccines and apoptosis: to kill or not to kill? // *J. Clin. Invest.* – 2003. – V. 112. – N. 1. – P. 22–24.
165. Leroux-Roels G., Van Hecke E., Michiels W., Voet P., Hauser P., Pêtre J. Correlation between in vivo humoral and in vitro cellular immune responses following immunization with hepatitis B surface antigen (HBsAg) vaccines // *Vaccine*. – 1994. – V. 12. – N. 9. – P. 812–818.
166. Letourneau S., Im E.J., Mashishi T., Brereton C., Bridgeman A., Yang H., Dorrell L., Dong T., Korber B., McMichael A.J., Hanke T. Design and pre-clinical

- evaluation of a universal HIV-1 vaccine // *PLoS One*. – 2007. – V. 2. – N. 10. – P. e984.
167. Li F., Horton H., Gilbert P.B., McElrath J.M., Corey L., Self S.G. HIV-1 CTL-based vaccine immunogen selection: antigen diversity and cellular response features // *Curr. HIV Res.* – 2007. – V. 5. – N. 1. – P. 97–107.
  168. Liang X., Casimiro D.R., Schleif W.A., Wang F., Davies M.E., Zhang Z.Q., Fu T.M., Finnefrock A.C., Handt L., Citron M.P., Heidecker G., Tang A., Chen M., Wilson K.A., Gabryelski L., McElhaugh M., Carella A., Moyer C., Huang L., Vitelli S., Patel D., Lin J., Emini E.A., Shiver J.W. Vectored Gag and Env but not Tat show efficacy against simian-human immunodeficiency virus 89.6P challenge in Mamu-A\*01-negative rhesus monkeys // *J. Virol.* – 2005. – V. 79. – N. 19. – P. 12321–12331.
  169. Lindenstrom T., Agger E.M., Korsholm K.S., Darrah P.A., Aagaard C., Seder R.A., Rosenkrands I., Andersen P. Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells // *J. Immunol.* – 2009. – V. 182. – N. 12. – P. 8047–8055.
  170. Livingston B.D., Newman M., Crimi C., McKinney D., Chesnut R., Sette A. Optimization of epitope processing enhances immunogenicity of multiepitope DNA vaccines // *Vaccine*. – 2001. – V. 19. – N. 32. – P. 4652–4660.
  171. Lovelace P., Maecker H.T. Multiparameter intracellular cytokine staining // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – V. 699. – P. 165–178.
  172. Lubeck M.D., Natuk R.J., Chengalvala M., Chanda P.K., Murthy K.K., Murthy S., Mizutani S., Lee S.G., Wade M.S., Bhat B.M. Immunogenicity of recombinant adenovirus-human immunodeficiency virus vaccines in chimpanzees following intranasal administration // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. – 1994. – V. 10. – N. 11. – P. 1443–1449.
  173. Luckey C.J., King G.M., Marto J.A., Venketeswaran S., Maier B.F., Crotzer V.L., Colella T.A., Shabanowitz J., Hunt D.F., Engelhard V.H. Proteasomes can either generate or destroy MHC class I epitopes: Evidence for nonproteasomal epitope generation in the cytosol // *J. Immunol.* – 1998. – V. 161. – N. 1. – P. 112–121.
  174. Luescher I.F., Cerottini J.C., Romero P. Photoaffinity-labeling of the t-cell receptor on cloned cytotoxic t-lymphocytes by covalent photoreactive ligand // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – N. 8. – P. 5574–5582.
  175. Luescher I.F., Vivier E., Layer A., Mahiou J., Godeau F., Malissen B., Romero P. CD8 modulation of t-cell antigen receptor-ligand interactions on living cytotoxic t-lymphocytes // *Nature*. – 1995. – V. 373. – N. 6512. – P. 353–356.
  176. Lumsden J.M., Schwenk R.J., Rein L.E., Moris P., Janssens M., Ofori-Anyinam O., Cohen J., Kester K.E., Heppner D.G., Krzych U. Protective immunity induced with the RTS,S/AS vaccine is associated with IL-2 and TNF-alpha producing

- effector and central memory CD4T cells // *PLoS One*. – 2011. – V. 6. – N. 7. – P. e20775.
177. Lyons A.B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution // *J. Immunol. Methods*. – 2000. – V. 243. – N. 1–2. – P. 147–154.
  178. Lyons A.B., Parish C.R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry // *J. Immunol. Methods*. – 1994. – V. 171. – N. 1. – P. 131–137.
  179. MacGregor R.R., Ginsberg R., Ugen K.E., Baine Y., Kang C.U., Tu X.M., Higgins T., Weiner D.B., Boyer J.D. T-cell responses induced in normal volunteers immunized with a DNA-based vaccine containing HIV-1 env and rev // *AIDS*. – 2002. – V. 16. – N. 16. – P. 2137–2143.
  180. Maecker H.T., Hassler J., Payne J.K., Summers A., Comatas K., Ghanayem M., Morse M.A., Clay T.M., Lyster H.K., Bhatia S., Ghanekar S.A., Maino V.C., Delarosa C., Disis M.L. Precision and linearity targets for validation of an IFN $\gamma$  ELISPOT, cytokine flow cytometry, and tetramer assay using CMV peptides // *BMC Immunol.* – 2008. – V. 9. – P. 9.
  181. Malyguine A., Strobl S., Zaritskaya L., Baseler M., Shafer-Weaver K. New approaches for monitoring CTL activity in clinical trials // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2007. – V. 601. – P. 273–284.
  182. Masopust D., Jiang J., Shen H., Lefrançois L. Direct analysis of the dynamics of the intestinal mucosa CD8 T cell response to systemic virus infection // *J. Immunol.* – 2001. – V. 166. – N. 4. – P. 2348–2356.
  183. McKay P.F., Schmitz J.E., Barouch D.H., Kuroda M.J., Lifton M.A., Nickerson C.E., Gorgone D.A., Letvin N.L. Vaccine protection against functional CTL abnormalities in simian human immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys // *J Immunol.* – 2002. – V. 168. – N. 1. – P. 332–337.
  184. McKinnon L.R., Card C.M. HIV vaccine efficacy trials: A brief history, and options for going forward // *AIDS Rev.* – 2010. – V. 12. – N. 4. – P. 209–217.
  185. McMichael A. Prospects for an AIDS vaccine // *Clin. Med.* – 2003. – V. 3. – N. 3. – P. 269–272.
  186. McMichael A., Hanke T. The quest for an AIDS vaccine: is the CD8 $^{+}$  T-cell approach feasible? // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – V. 2. – N. 4. – P. 283–291.
  187. McMichael A.J., Borrow P., Tomaras G.D., Goonetilleke N., Haynes B.F. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development // *Nat. Rev. Immunol.* – 2010. – V. 10. – N. 1. – P. 11–23.
  188. McMichael A.J., Callan M., Appay V., Hanke T., Ogg G., Rowland-Jones S. The dynamics of the cellular immune response to HIV infection: implications for vaccination // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2000. – V. 355. – N. 1400. – P. 1007–1011.
  189. McMichael A.J., Haynes B.F. Lessons learned from HIV-1 vaccine trials: new priorities and directions // *Nat. Immunol.* – 2012. – V. 13. – N. 5. – P. 423–427.

190. McMichael A.J., Rowland-Jones S.L. Cellular immune responses to HIV // *Nature*. – 2001. – V. 410. – N. 6831. – P. 980–987.
191. Meidenbauer N., Hoffmann T., Donnenberg A.D. Direct visualization of antigen-specific T cells using peptide-MHC-class I tetrameric complexes // *Methods*. – 2003. – V. 31. – N. 2. – P. 160–171.
192. Mosmann T.R., Coffman R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties // *Annu. Rev. Immunol.* – 1989. – V. 7. – P. 145–173.
193. Mudd P.A., Martins M.A., Ericson A.J., Tully D.C., Power K.A., Bean A.T., Piaskowski S.M., Duan L., Seese A., Gladden A.D., Weisgrau K.L., Furlott J.R., Kim Y.I., Veloso de Santana M.G., Rakasz E., Capuano S. 3rd, Wilson N.A., Bonaldo M.C., Galler R., Allison D.B., Piatak M. Jr., Haase A.T., Lifson J.D., Allen T.M., Watkins D.I. Vaccine-induced CD8(+) T cells control AIDS virus replication // *Nature*. – 2012. – V. 491. – N. 7422. – P. 129–133.
194. Murali-Krishna K., Lau L.L., Sambhara S., Lemonnier F., Altman J., Ahmed R. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice // *Science*. – 1999. – V. 286. – N. 5443. – P. 1377–1381.
195. Murashev B., Kazennova E., Kozlov A., Murasheva I., Dukhovlinova E., Galachyants Y., Dorofeeva E., Dukhovlinov I., Smirnova G., Masharsky A., Klimov N., Kozlov A.P. Immunogenicity of candidate DNA vaccine based on subtype A of human immunodeficiency virus type 1 predominant in Russia // *Biotechnol. J.* – 2007. – V. 2. – N. 7. – P. 871.
196. Mwau M., Cebere I., Sutton J., Chikoti P., Winstone N., Wee E.G., Beattie T., Chen Y.H., Dorrell L., McShane H., Schmidt C., Brooks M., Patel S., Roberts J., Conlon C., Rowland-Jones S.L., Bwayo J.J., McMichael A.J., Hanke T. A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans // *J. Gen. Virol.* – 2004. – V. 85 (Pt 4) – P. 911–919.
197. Nitayaphan S., Pitisuttithum P., Karnasuta C., Eamsila C., de Souza M., Morgan P., Polonis V., Benenson M., VanCott T., Ratto-Kim S., Kim J., Thapinta D., Garner R., Bussaratid V., Singharaj P., el-Habib R., Gurunathan S., Heyward W., Birx D., McNeil J., Brown A.E., Thai AIDS Vaccine Evaluation Group. Safety and immunogenicity of an HIV subtype B and E prime-boost vaccine combination in HIV-negative Thai adults // *J. Infect. Dis.* – 2004. – V. 90. – N. 4. – P. 702–706.
198. Nomura L., Maino V.C., Maecker H.T. Standardization and optimization of multiparameter intracellular cytokine staining // *Cytometry A*. – 2008. – V. 73. – N. 11. – P. 984–991.
199. Ogata S., Fukuda M. Lysosomal targeting of Limp II membrane glycoprotein requires a novel Leu-Ile motif at a particular position in its cytoplasmic tail // *The J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – N. 7. – P. 5210–5217.

200. Ogg G.S., McMichael A.J. Quantitation of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses // *Immunol. Lett.* – 1999. – V. 66. – N. 1–3. – P. 77–80.
201. Pantaleo G., Esteban M., Jacobs B., Tartaglia J. Poxvirus vector-based HIV vaccines // *Curr. Opin. HIV AIDS.* – 2010. – V. 5. – N. 5. – P. 391–396.
202. Patch J.R., Pedersen L.E., Toka F.N., Moraes M., Grubman M.J., Nielsen M., Jungersen G., Buus S., Golde W.T. Induction of foot-and-mouth disease virus-specific cytotoxic T cell killing by vaccination // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2011. – V. 18. – N. 2. – P. 280–288.
203. Peters B., Bulik S., Tampe R., Van Endert P.M., Holzhütter H.G. Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors // *J. Immunol.* – 2003. – V. 171. – N. 4. – P. 1741–1749.
204. Pillai V.B., Hellerstein M., Yu T., Amara R.R., Robinson H.L. Comparative studies on in vitro expression and in vivo immunogenicity of supercoiled and open circular forms of plasmid DNA vaccines // *Vaccine.* – 2008. – V. 26. – N. 8. – P. 1136–1141.
205. Pitisuttithum P., Choopanya K., Rerk-Ngam S. HIV-vaccine research and development in Thailand: evolution and challenges // *Vaccine.* – 2010. – V. 28. – Suppl 2:B45–9.
206. Pitisuttithum P., Francis D.P., Esparza J., Thongcharoen P. HIV vaccine research and development in Thailand. Bangkok.: Mahidol University, 2006. 351 p.
207. Pitisuttithum P., Gilbert P., Gurwith M., Heyward W., Martin M., van Griensven F., Hu D., Tappero J.W., Choopanya K., Bangkok Vaccine Evaluation Group. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand // *J. Infect. Dis.* – 2006. – V. 194. – N. 12. – P. 1661–1671.
208. Plotkin S.A. Correlates of protection induced by vaccination // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2010. – V. 17. – N. 7. – P. 1055–1065.
209. Plotkin S.L., Plotkin S.A. A short history of vaccination. *Vaccines.* 2008. Philadelphia, PA: Elsevier Inc. P. 1– 16.
210. Pogue R.R., Eron J., Frelinger J.A., Matsui M. Amino-terminal alteration of the HLA-A\*0201-restricted human immunodeficiency virus pol peptide increases complex stability and in vitro immunogenicity // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1995. – V. 92. – N. 18. – P. 8166–8170.
211. Porgador A., Staats H.F., Faiola B., Gilboa E., Palker T.J. Intranasal immunization with CTL epitope peptides from HIV-1 or ovalbumin and the mucosal adjuvant cholera toxin induces peptide-specific CTLs and protection against tumor development in vivo // *J. Immunol.* – 1997. – V. 158. – N. 2. – P. 834–841.
212. Porgador A., Yewdell J.W., Deng Y.P., Bennink J.R., Germain R.N. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide MHC class I complexes using a monoclonal antibody // *Immunity.* – 1997. – V. 6. – N. 6. – P. 715–726.

213. Priddy F.H., Brown D., Kublin J., Monahan K., Wright D.P., Lalezari J., Santiago S., Marmor M., Lally M., Novak R.M., Brown S.J., Kulkarni P., Dubey S.A., Kierstead L.S., Casimiro D.R., Mogg R., DiNubile M.J., Shiver J.W., Leavitt R.Y., Robertson M.N., Mehrotra D.V., Quirk E.; Merck V520-016 Study Group. Safety and Immunogenicity of a Replication-Incompetent Adenovirus Type 5 HIV-1 Clade B gag/pol/nef Vaccine in Healthy Adults // *Clin. Infect. Dis.* – 2008. – V. 46. – N. 11. – P. 1769–1781.
214. R Core Team: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, 2014.
215. Reece W.H., Pinder M., Gothard P.K., Milligan P., Bojang K., Doherty T., Plebanski M., Akinwunmi P., Everaere S., Watkins K.R., Voss G., Tornieporth N., Allouche A., Greenwood B.M., Kester K.E., McAdam K.P., Cohen J., Hill A.V. A CD4(+) T-cell immune response to a conserved epitope in the circumsporozoite protein correlates with protection from natural plasmodium falciparum infection and disease // *Nat. Med.* – 2004. – V.10. – N. 4. – P. 406 – 410.
216. 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.
217. Reichstetter S., Ettinger R.A., Liu A.W., Gebe J.A., Nepom G.T., Kwok W.W. Distinct T cell interactions with HLA class II tetramers characterize a spectrum of TCR affinities in the human antigen-specific T cell response // *J. Immunol.* – 2000. – V. 165. – N. 12. – P. 6994–6998.
218. Ren Y.G., Wu B., Pan Y., Lv F., Kong X., Luo X., Li Y., Yang Q. Characterization of the binding profile of peptide to transporter associated with antigen processing (TAP) using Gaussian process regression // *Comput. Biol. Med.* – 2011. – V. 41. – N. 9. – P. 865–870.
219. Rerks-Ngarm S., Pitisuttithum P., Nitayaphan S., Kaewkungwal J., Chiu J., Paris R., Prem Sri N., Namwat C., de Souza M., Adams E., Benenson M., Gurunathan S., Tartaglia J., McNeil J.G., Francis D.P., Stablein D., Birx D.L., Chunsuttiwat S., Khamboonruang C., Thongcharoen P., Robb M.L., Michael N.L., Kunasol P., Kim J.H., MOPH-TAVEG Investigators. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – V. 361. – N. 23. – P. 2209–2220.
220. Reuter M.A., Pombo C., Betts M.R. Cytokine production and dysregulation in HIV pathogenesis: lessons for development of therapeutics and vaccines // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2012. – V. 23. – N. 4–5. – P. 181–191.
221. Riviere Y., McChesney M.B., Porrot F., Tanneau-Salvadori F., Sansonetti P., Lopez O., Pialoux G., Feuillie V., Mollereau M., Chamaret S. Gag-specific cytotoxic responses to HIV type 1 are associated with a decreased risk of progression to AIDS-related complex or AIDS // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* – 1995. – V. 11. – N. 8. – P. 903–907.

222. Robinson H.L., Montefiori D.C., Johnson R.P., Manson K.H., Kalish M.L., Lifson J.D., Rizvi T.A., Lu S., Hu S.L., Mazzara G.P., Panicali D.L., Herndon J.G., Glickman R., Candido M.A., Lydy S.L., Wyand M.S., McClure H.M. Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations // *Nat. Med.* – 1999. – V. 5. – N. 5. – P. 526–534.
223. Robinson H.L., Montefiori D.C., Villinger F., Robinson J.E., Sharma S., Wyatt L.S., Earl P.L., McClure H.M., Moss B., Amara R.R. Studies on GM-CSF DNA as an adjuvant for neutralizing Ab elicited by a DNA/MVA immunodeficiency virus vaccine // *Virology.* – 2006. – V. 352. – N. 2. – P. 285–294.
224. Rodriguez F., An L.L., Harkins S., Zhang J., Yokoyama M., Widera G., Fuller J.T., Kincaid C., Campbell I.L., Whitton J.L. DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination // *J. Virol.* – 1998. – V. 72. – N. 6. – P. 5174–5181.
225. Rodriguez F., Harkins S., Redwine J.M., de Pereda J.M., Whitton J.L. CD4(+) T cells induced by a DNA vaccine: immunological consequences of epitope-specific lysosomal targeting // *J. Virol.* – 2001. – V. 75. – N. 21. – P. 10421–10430.
226. Rodriguez F., Zhang J., Whitton J.L. DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction // *J. Virol.* – 1997. – V. 71. – N. 11. – P. 8497–8503.
227. Rolland M., Heckerman D., Deng W., Rousseau C.M., Coovadia H., Bishop K., Goulder P.J., Walker B.D., Brander C., Mullins J.I. Broad and Gag-biased HIV-1 epitope repertoires are associated with lower viral loads // *PLoS One.* – 2008. – V. 3. – N. 1. – P. e1424.
228. Romero P., Dunbar P.R., Valmori D., Pittet M., Ogg G.S., Rimoldi D., Chen J.L., Liénard D., Cerottini J.C., Cerundolo V. Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes // *J. Exp. Med.* – 1998. – V. 188. – N. 9. – P. 1641–1650.
229. 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., Hanke T. Long peptides induce polyfunctional T cells against conserved regions of HIV-1 with superior breadth to single-gene vaccines in macaques // *Eur. J. Immunol.* – 2010. – V. 40. – N. 7. – P. 1973–1984.
230. Rosati M., Valentin A., Jalah R., Patel V., von Gegerfelt A., Bergamaschi C., Alicea C., Weiss D., Treece J., Pal R., Markham P.D., Marques E.T., August J.T., Khan A., Draghia-Akli R., Felber B.K., Pavlakis G.N. Increased immune responses in rhesus macaques by DNA vaccination combined with electroporation // *Vaccine.* – 2008. – V. 26. – N. 40. – P. 5223–5229.

231. Saade F., Gorski S.A., Petrovsky N. Pushing the frontiers of T-cell vaccines: accurate measurement of human T-cell responses // *Expert Rev. Vaccines*. – 2012. – V. 11. – N. 12. – P. 1459–1470.
232. Sacha J.B., Chung C., Rakasz E.G. Spencer S.P., Jonas A.K., Bean A.T., Lee W., Burwitz B.J., Stephany J.J., Loffredo J.T., Allison D.B., Adnan S., Hoji A., Wilson N.A., Friedrich T.C., Lifson J.D., Yang O.O., Watkins D.I. Gag-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression // *J. Immunol.* – 2007. – V. 178. – N. 5. – P. 2746–2754.
233. Saez-Cirion A., Lacabartz C., Lambotte O., Versmisse P., Urrutia A., Boufassa F., Barré-Sinoussi F., Delfraissy JF, Sinet M, Pancino G, Venet A; Agence Nationale de Recherches sur le Sida EP36 HIV Controllers Study Group. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype // *Proc Natl Acad Sci.* – 2007. – V. 104. – N. 16. – P. 6776–6781.
234. Saez-Cirion A., Sinet M., Shin S.Y., Urrutia A., Versmisse P., Lacabartz C., Boufassa F., Avettand-Fènoël V., Rouzioux C., Delfraissy J.F., Barré-Sinoussi F., Lambotte O., Venet A., Pancino G., ANRS EP36 HIV Controllers Study Group. Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses // *J. Immunol.* – 2009. – V. 182. – N. 12. – P. 7828–7837.
235. Sandoval I.V., Arredondo J.J., Alcalde J., Gonzalez Noriega A., Vandekerckhove J., Jimenez M.A., Rico M. The residues Leu(Ile)475-Ile(Leu, Val, Ala)476, contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein LIMP II to lysosomes // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – N. 9. – P. 6622–6631.
236. Sanou M.P., De Groot A.S., Murphey-Corb M., Levy J.A., Yamamoto J.K. HIV-1 Vaccine Trials: Evolving Concepts and Designs // *Open AIDS J.* – 2012. – V. 6. – P. – 274–788.
237. Sardewsai N.Y., Weiner D.B. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success // *Curr. Opin. Immunol.* – 2011. – V. 23. – N. 3. – P. 421–429.
238. Sasaki S., Amara R.R., Yeow W.S., Pitha P.M., Robinson H.L. Regulation of DNARaised immune responses by cotransfected interferon regulatory factors // *J. Virol.* – 2002. – V. 76. – N. 13. – P. 6652–6659.
239. Saunders K.O., Rudicell R.S., Nabel G.J. The design and evaluation of HIV-1 vaccines // *AIDS.* – 2012. – V. 26. – N. 10. – P. 1293–302.
240. Schmid D., Pypaert M., Munz C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes // *Immunity.* – 2007. – V. 26. – N. 1. – P. 79–92.
241. Schmidt J., Dojcinovic D., Guillaume P., Luescher I. Analysis, isolation, and activation of antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells by soluble MHC-peptide complexes // *Front. Immunol.* – 2013. – V. 4. – P. 218.



242. Schmitz J.E., Kuroda M.J., Santra S., Sasseville V.G., Simon M.A., Lifton M.A., Racz P., Tenner-Racz K., Dalesandro M., Scallon B.J., Ghayeb J., Forman M.A., Montefiori D.C., Rieber E.P., Letvin N.L., Reimann K.A. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8<sup>+</sup> lymphocytes // *Science*. – 1999. – V. 283. – N. 5403. – P. 857–860.
243. Schneider S.C., Ohmen J., Fosdick L., Gladstone B., Guo J., Ametani A., Sercarz E.E., Deng H. Cutting edge: Introduction of an endopeptidase cleavage motif into a determinant flanking region of hen egg lysozyme results in enhanced T cell determinant display // *J. Immunol.* – 2000. – V. 165. – N. 1. – P. 20–23.
244. Schoenly K.A., Weiner D.B. Human immunodeficiency virus type 1 vaccine development: recent advances in the cytotoxic T-lymphocyte platform “spotty business” // *J. Virol.* – 2008. – V. 82. – N. 7. – P. 3166–3180.
245. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions // *J. Leukoc. Biol.* – 2004. – V. 75. – N. 2. – P. 163–189.
246. Sette A., Sidney J. HLA supertypes and supermotifs: a functional perspective on HLA polymorphism // *Curr. Opin. Immunol.* – 1998. – V. 10. – N. 4. – P. 478–482.
247. Shebl F.M., Pinto L.A., García-Piñeres A., Lempicki R., Williams M., Harro C., Hildesheim A. Comparison of mRNA and protein measures of cytokines following vaccination with human papillomavirus-16 L1 virus-like particles // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2010. – V. 19. – N. 4. – P. 978–981.
248. Shedlock D.J., Talbott K.T., Morrow M.P., Ferraro B., Hokey D.A., Muthumani K., Weiner D.B. Ki-67 staining for determination of rhesus macaque T cell proliferative responses ex vivo // *Cytometry*. – 2010. – V. 77. – N. 3. – P. 275–284.
249. Shen L., Siliciano R.F. Viral reservoirs, residual viremia, and the potential of highly active antiretroviral therapy to eradicate HIV infection // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2008. – V. 122. – N. 1. – P. 22–28.
250. Sidney J., Grey H.M., Kubo R.T., Sette A. Practical, biochemical and evolutionary implications of the discovery of HLA class I supermotifs // *Immunol. Today*. – 1996. – V. 17. – N. 6. – P. 261–266.
251. Siegrist C.A. Vaccinology update for 2008: what's new in Switzerland? // *Rev. Med. Suisse*. – 2008. – V. 4. – N. 139. – P. 72–75.
252. Sims S., Willberg C., Klenerman P. MHC-peptide tetramers for the analysis of antigen-specific T cells // *Expert Rev. Vaccines*. – 2010. – V. 9. – N. 7. – P. 765–774.
253. Smith J.G., Liu X., Kaufhold R.M., Clair J., Caulfield M.J. Development and validation of a  $\gamma$  interferon ELISPOT assay for quantitation of cellular immune responses to varicella-zoster virus // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2001. – V. 8. – N. 5. – P. 871–879.
254. Snyder H.L., Bacik I., Yewdell J.W., Behrens T.W., Bennink J.R. Promiscuous liberation of MHC-class I-binding peptides from the C termini of membrane and

- soluble proteins in the secretory pathway // *Eur. J. Immunol.* – 1998. – V. 28. – N. 4. – P. 1339–1346.
255. Song J., Lee M.H., Lee G.J., Yoo C.M., Hwang I. Arabidopsis EPSIN1 plays an important role in vacuolar trafficking of soluble cargo proteins in plant cells via interactions with clathrin, AP-1, VTI11, and VSR1 // *Plant Cell.* – 2006. – V. 18. – N. 9. – P. 2258–2274.
  256. Sopp P., Howard C.J., Hope J.C. Flow cytometric detection of gamma interferon can effectively discriminate *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated cattle from *M. bovis*-infected cattle // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2006. – V. 13. – N. 12. – P. 1343–1348.
  257. Spearman P., Kalams S., Elizaga M., Metch B., Chiu Y.L., Allen M., Weinhold K.J., Ferrari G., Parker S.D., McElrath M.J., Frey S.E., Fuchs J.D., Keefer M.C., Lubeck M.D., Egan M., Braun R., Eldridge J.H., Haynes B.F., Corey L., NIAID HIV Vaccine Trials Network. Safety and immunogenicity of a CTL multiepitope peptide vaccine for HIV with or without GM-CSF in a phase I trial // *Vaccine.* – 2009. – V. 27. – N. 2. – P. 243–249.
  258. Spencer J.V., Braciale T.J. Incomplete CD8(+) T lymphocyte differentiation as a mechanism for subdominant cytotoxic T lymphocyte responses to a viral antigen // *J. Exp. Med.* – 2000. – V. 191. – N. 10. – P. 1687–1698.
  259. Sprent J., Judge A.D., Zhang X. Cytokines and memory-phenotype CD8+ cells // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2002. – V. 512. – P. 147–153.
  260. Starodubova E.S., Isaguliants M.G., Kuzmenko Y.V., Latanova A.A., Krotova O.A., Karpov V.L. Fusion to the Lysosome Targeting Signal of the Invariant Chain Alters the Processing and Enhances the Immunogenicity of HIV-1 Reverse Transcriptase // *Acta Naturae.* – 2014. – V. 6. – N. 1. – P. 61–68.
  261. Stemberger C., Huster K.M., Koffler M., Anderl F., Schiemann M., Wagner H., Busch D.H. A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets // *Immunity.* – 2007. – V. 27. – N. 6. – P. 985–997.
  262. Sun Y., Iglesias E., Samri A., Kamkamidze G., Decoville T., Carcelain G., Autran B. A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8 T cells // *J. Immunol. Methods.* – 2003. – V. 272. – N. 1–2. – P. 23–34.
  263. Sylvester-Hvid C., Kristensen N., Blicher T., Ferre H., Lauemoller S.L., Wolf X.A., Lamberth K., Nissen M.H., Pedersen L.Ø., Buus S. Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide—MHC class I interaction // *Tissue Antigens.* – 2002. – V. 59. – N. 4. – P. 251–258.
  264. Takahashi H., Nakagawa Y., Pendleton C.D., Houghten R.A., Yokomuro K., Germain R.N., Berzofsky J.A. Induction of broadly cross-reactive cytotoxic T cells recognizing an HIV-1 envelope determinant // *Science.* – 1992. – V. 255. – N. 5042. – P. 333–336.

265. Takata H., Takiguchi M. Three memory subsets of human CD8<sup>+</sup> T cells differently expressing three cytolytic effector molecules // *J. Immunol.* – 2006. – V. 177. – N. 7. – P. 4330–4340.
266. Tangri S., Ishioka G.Y., Huang X., Sidney J., Southwood S., Fikes J., Sette A. Structural features of peptide analogs of human histocompatibility leukocyte antigen class I epitopes that are more potent and immunogenic than wild-type peptide // *J. Exp. Med.* – 2001. – V. 194. – N. 6. – P. 833–846.
267. Tavel J.A., Martin J.E., Kelly G.G., Enama M.E., Shen J.M., Gomez P.L., Andrews C.A., Koup R.A., Bailer R.T., Stein J.A., Roederer M., Nabel G.J., Graham B.S. Safety and immunogenicity of a Gag-Pol candidate HIV-1 DNA vaccine administered by a needle-free device in HIV-1-seronegative subjects // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* – 2007. – V. 44. – N. 5. – P. 601–605.
268. Thalhamer J., Weiss R., Scheiblhofer S. *Gene Vaccines*. Springer; Vienna: 2011. 330 p.
269. Tobery T.W., Siliciano R.F. Targeting of HIV-1 Antigens for Rapid Intracellular Degradation Enhances Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Recognition and the Induction of De Novo CTL Responses In Vivo After Immunization // *J. Exp. Med.* – 1997. – V. 185. – N. 5. – P. 909–920.
270. Toes R.E., Nussbaum A.K., Degermann S., Schirle M., Emmerich N.P., Kraft M., Laplace C., Zwinderman A., Dick T.P., Müller J., Schönfisch B., Schmid C., Fehling H.J., Stevanovic S., Rammensee H.G., Schild H. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products // *J. Exp. Med.* – 2001. – V. 194. – N. 1. – P. 1–12.
271. Towbin H., Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding - current status and outlook // *J. Immunol. Methods.* – 1984. – V. 72. – N. 2. – P. 313–340.
272. Tsujimoto M., Yip Y.K., Vilcek J. Interferon-gamma enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor // *J. Immunol.* – 1986. – V. 136. – N. 7. – P. 2441–2444.
273. Uebel S., Tampé R. Specificity of the proteasome and the TAP transporter // *Curr Opin Immunol.* – 1999. – V. 11. – N. 2. – P. 203–208.
274. Varshavsky A., Turner G., Du F.Y., Xie Y.M. Felix Hoppe-Seyler Lecture 2000. The ubiquitin system and the N-end rule pathway // *Biol. Chem.* – 2000. – V. 381. – N. 9–10. – P. 779–789.
275. Vasan S., Hurley A., Schlesinger S.J., Hannaman D., Gardiner D.F., Dugin D.P., Boente-Carrera M., Vittorino R., Caskey M., Andersen J., Huang Y., Cox J.H., Tarragona-Fiol T., Gill D.K., Cheeseman H., Clark L., Dally L., Smith C., Schmidt C., Park H.H., Kopycinski J.T., Gilmour J., Fast P., Bernard R., Ho D.D. In vivo electroporation enhances the immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine candidate in healthy volunteers // *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – N. 5. – P. e19252.
276. Versteegen J.M., Logtenberg T., Ballieux R.E. Enumeration of IFN- $\gamma$ -producing human lymphocytes by spot-ELISA. A method to detect lymphokine-producing

- lymphocytes at the single-cell level // *J. Immunol. Methods.* – 1988. – V. 111. – N. 1. – P. 25–29.
277. Voges D., Zwickl P., Baumeister W. The 26S proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis // *Annu. Rev. Biochem.* –1999. – V. 68. – P. 1015–1068.
278. Vollers S.S., Stern L.J. Class II major histocompatibility complex tetramer staining: progress, problems, and prospects // *Immunology.* – 2008. – V. 123. – N. 3. – P. 305–313.
279. Walker B.D. Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment // *Top. HIV Med.* – 2007. – V. 15. – N. 4. – P. 134–136.
280. Walker B.D., Ahmed R., Plotkin S. Moving ahead an HIV vaccine: use both arms to beat HIV // *Nat. Med.* – 2011. –V. 7. – N. 10. – P. 1194–1195.
281. Walker C.M., Moody D.J., Stites D.P., Levy J.A. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication // *Science.* – 1986. – V. 234. – N. 4783. – P. 1563–1566.
282. Watkins D.I. The hope for an HIV vaccine based on induction of CD8+ T lymphocytes // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 2008. – V. 103. – N. 2. – P. 119–129.
283. Webster R.G., Robinson H.L. DNA vaccines: a review of developments // *BioDrugs.* – 1997. – V. 8. – N. 4. – P. 273–292.
284. Weinberger E.E., Isakovic A., Scheiblhofer S., Ramsauer C., Reiter K., Hauser-Kronberger C., Thalhamer J., Weiss R. The influence of antigen targeting to sub-cellular compartments on the anti-allergic potential of a DNA vaccine // *Vaccine.* – 2013. – V. 31. – N. 51. – P. 6113–6121.
285. Wherry E.J., Ha S.J., Kaech S.M., Haining W.N., Sarkar S., Kalia V., Subramaniam S., Blattman J.N., Barber D.L., Ahmed R. Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection // *Immunity.* – 2007. – V. 27. – N. 4. – P. 670–684.
286. Williams M.A., Bevan M.J. Immunology: exhausted T cells perk up // *Nature.* – 2006. – V. 439. – N. 7077. – P. 669–670.
287. Wilson C.C., Palmer B., Southwood S., Sidney J., Higashimoto Y., Appella E., Chesnut R., Sette A., Livingston B.D. Identification and Antigenicity of Broadly Cross-Reactive and Conserved Human Immunodeficiency Virus Type 1-Derived Helper T-Lymphocyte Epitopes // *J. Virol.* – 2001. – V. 75. – N. 9. – P. 4195–4207.
288. Wren L., Kent S.J. HIV Vaccine efficacy trial: glimmers of hope and the potential role of antibody-dependent cellular cytotoxicity // *Hum. Vaccin.* –2011. – V. 7. – N. 4. – P. 466–473.
289. Wu T.C., Guarnieri F.G., Staveley-O'Carroll K.F., Viscidi R.P., Levitsky H.I., Hedrick L., Cho K.R., August J.T., Pardoll D.M. Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class-II presentation of antigens // *Proc. Natl Acad. Sci.* – 1995. – V. 92. – N. 25. – P. 11671–11675.

290. Wu Y., Kipps T.J. Deoxyribonucleic acid vaccines encoding antigens with rapid proteasome-dependent degradation are highly efficient inducers of cytolytic T lymphocytes // *J. Immunol.* – 1997. – V. 159. – N. 12. – P. 6037–6043.
291. Xu X., Fu X.Y., Plate J., Chong A.S. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression // *Cancer Res.* – 1998. – V. 58. – N. 13. – P. 2832–2837.
292. Xu X.N., Screaton G.R. MHC/peptide tetramer-based studies of T cell function // *J. Immunol. Methods.* – 2002. – V. 268. – N. 1. – P. 21–28.
293. Yamane H., Paul W.E. Memory CD4<sup>+</sup> T cells: fate determination, positive feedback and plasticity // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2012. – V. 69. – N. 10. – P. 1577–1583.
294. Yang O.O., Kalams S. A., Trocha A., Cao H., Luster A., Johnson R. P., Walker B. D. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8<sup>+</sup> cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms // *J. Virol.* – 1997. – V. 71. – N. 4. – P. 3120–3128.
295. Yates N. L., Liao H.-X., Fong Y., de Camp A., Vandergrift N. A., Williams W. T., Alam S. M., Ferrari G., Yang Z.-Y., Seaton K. E., Berman P. W., Alpert M. D., Evans D. T., O'Connell R. J., Francis D., Sinangil F., Lee C., Nitayaphan S., Rerks-Ngarm S., Kaewkungwal J., Pitisuttithum P., Tartaglia J., Pinter A., Zolla-Pazner S., Gilbert P. B., Nabel G. J., Michael N. L., Kim J. H., Montefiori D. C., Haynes B. F., Tomaras G. D. Vaccine-Induced Env V1-V2 IgG3 Correlates with Lower HIV-1 Infection Risk and Declines Soon After Vaccination // *Sci. Transl. Med.* – 2014. – V. 6. – N. 228. – P. 228 – 239.
296. Yewdell J.W., Bennink J.R. Mechanisms of viral interference with MHC class I antigen processing and presentation // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 1999. – V. 15. – P. 579–606.
297. Yu X.G., Shang H., Addo M.M., Eldridge R.L., Phillips M.N., Feeney M.E., Strick D, Brander C, Goulder PJ, Rosenberg ES, Walker BD, Altfeld M; HIV Study Collaboration. Important contribution of p15 Gag-specific responses to the total Gag-specific CTL responses // *AIDS.* – 2002. – V. 16. – N. 3. – P. 321–328.
298. Yusim K., Korber B.T. M., Brander C., Barouch D., de Boer R., Haynes B.F., Koup R., Moore J.P., Walker B.D., Watkins D.I. HIV Molecular Immunology. Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, New Mexico, 2013. P. 3–25.
299. Zaritskaya L., Shurin M.R., Sayers T.J., Malyguine A.M. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity // *Expert Rev. Vaccines.* – 2010. – V. 9. – N. 6. – P. 601–616.
300. Zhang W., Caspell R., Karulin A.Y. Ahmad M., Haicheur N., Abdelsalam A., Johannesen K., Vignard V., Dudzik P., Georgakopoulou K., Mihaylova A., Silina K., Aptsiauri N., Adams V., Lehmann P.V., McArdle S. ELISPOT assays provide reproducible results among different laboratories for T-cell immune monitoring –

- even in hands of ELISPOT-inexperienced investigators // J. Immunotoxicol. – 2009. – V. 6. – N. 4. – P. 227–234.
301. Zheng Z., Luo Y., McMaster G.K. Sensitive and quantitative measurement of gene expression directly from a small amount of whole blood // Clin. Chem. – 2006. – V. 52. – N. 7. – P. 1294–1302.
  302. Zhu H., Liu K.C., Cerny J., Imoto T., Moudgil K.D. Insertion of the dibasic motif in the flanking region of a cryptic self-determinant leads to activation of the epitope-specific T cells // J. Immunol. 2005. – V. 175. – N. 4. – P. 2252–2260.
  303. Zinkernagel R.M., Doherty P.C. H-2 compatability requirement for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures coded for in H-2K or H-2D // J. Exp. Med. – 1975. – V. 141. – N. 6. – P. 1427–1436.
  304. Zuniga R., Lucchetti A., Galvan P., Sanchez S., Sanchez C., Hernandez A., Sanchez H., Frahm N., Linde C.H., Hewitt H.S., Hildebrand W., Altfeld M., Allen T.M., Walker B.D., Korber B.T., Leitner T., Sanchez J., Brander C. Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control // J. Virol. – 2006. – V. 80. – N. 6. – P. 3122–3125.
  305. <http://spidnso.ru/index.php/professionals>
  306. <http://tepredict.sourceforge.net>
  307. <http://tepredict.sourceforge.net/PolyCTLDesigner.html>
  308. [http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/optimal\\_ctl\\_summary.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/tables/optimal_ctl_summary.html)
  309. <http://www.iavireport.org/Trials-Database/>
  310. <http://www.unaids.org/en/knowledgecentre/hivdata/epidemiology/epislides.asp>