

на правах рукописи

ЧИКАЕВ

Антон Николаевич

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

03.01.03 - Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Кольцово
2015**

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

Научный руководитель: Ильичев Александр Алексеевич, доктор биологических наук, профессор, ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», заведующий отделом биоинженерии

Официальные оппоненты: Невинский Георгий Александрович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией ферментов репарации, Институт химической биологии и фундаментальной медицины сибирского отделения Российской академии наук

Попова Нэлли Александровна, кандидат биологических наук, профессор, Новосибирский национальный исследовательский университет

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

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

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

В.А. Белявская

Общая характеристика работы

Актуальность темы. ВИЧ-1 является одним из самых хорошо изученных вирусов, однако до сих пор не удается найти эффективное средство профилактики данного заболевания. Заметного прогресса удалось добиться лишь в области разработки методов антиретровирусной терапии, позволяющих значительно продлевать жизнь ВИЧ-инфицированных. Тем не менее, они по-прежнему остаются паллиативным средством борьбы с вирусом и не способны остановить пандемию ВИЧ-1. Общеизвестно, что единственно возможным и реальным способом предотвратить распространение ВИЧ-инфекции является создание профилактической вакцины. Однако исследования в данной области сопряжены с принципиальными затруднениями: высокая генетическая и, как следствие, антигенная изменчивость ВИЧ-1 позволяет ему ускользать от защитного действия иммунной системы.

Одним из важнейших направлений исследований по созданию вакцины против ВИЧ-1 является идентификация фрагментов вирусных белков, узнаваемых нейтрализующими антителами широкого спектра действия (broadly neutralizing antibodies, bnAbs). Они связываются с консервативными участками вирусных белков, практически не подверженных мутагенезу, за счет чего обладают нейтрализующей активностью в отношении большого разнообразия первичных изолятов ВИЧ-1. Очень перспективной выглядит идея создания вакцин, способных индуцировать выработку подобных антител. Однако на практике реализовать ее оказалось сложно, поскольку большинство эпитопов, узнаваемых bnAbs, имеют сложную пространственную организацию, которую до сих пор не удается воспроизвести в составе искусственных иммуногенов. Возможным решением данной проблемы является создание рекомбинантной конструкции, которая экспонирует эпитопы в виде линейных аминокислотных последовательностей, имитирующих нативные участки поверхностных гликопротеинов ВИЧ-1. Предполагается, что при иммунизации она будет индуцировать образование одного или нескольких нейтрализующих антител, обладающих сходными с bnAbs-прототипами характеристиками. Для поиска могут использоваться методы комбинаторной биологии, в частности метод фагового дисплея, который позволяет проводить скрининг пептидных библиотек бактериофагов для идентификации последовательностей, обладающих требуемыми антигенными свойствами. Огромное разнообразие пептидов, располагающихся на

поверхности фагов, обеспечивает возможность выявить среди них те, которые эффективно взаимодействуют с антиген-распознающими участками антител, имитируя, таким образом, конформацию нативных эпитопов.

Целью данной работы является получение с помощью фагового дисплея пептидов-миметиков, узнаваемых нейтрализующими ВИЧ-1 антителами широкого спектра действия, и изучение их антигенных и иммуногенных свойств. В соответствии с поставленной целью необходимо было решить следующие задачи:

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

Научная новизна и практическая ценность. Впервые установлено, что отобранные пептиды-имитаторы способны конкурировать с ВИЧ-1 (штамм NL4-3) за связывание с нейтрализующими антителами широкого спектра действия IgG1b12 и VRC01 в реакции вируснейтрализации. Впервые установлено, что сыворотки кроликов, иммунизированных фагами, которые экспонируют пептиды-миметики эпитопов, узнаваемых антителами Z13e1, IgG1b12 и VRC01, обладают нейтрализующей активностью в отношении псевдотипированных частиц ВИЧ-1. Полученные пептиды-имитаторы могут быть использованы для конструирования искусственных иммуногенов, индуцирующих антитела против широкого спектра изолятов вируса иммунодефицита. Кроме того, пептиды-миметики можно будет использовать и для выявления ВИЧ-специфических антител.

Основные положения, выносимые на защиту. Аффинная селекция фаговых пептидных библиотек позволяет отобрать клоны, специфично взаимодействующие с

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

Апробация работы и публикации. По материалам диссертации опубликованы 4 статьи, 4 из которых – в журналах, рекомендованных ВАК для защиты диссертаций. Также результаты работы были представлены на международных и российских конференциях, по итогам которых было опубликовано 14 тезисов.

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

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста, включая 20 рисунков и 13 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы (184 наименования).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовались коммерческие фаговые библиотеки Ph.D.-12, Ph.D.-7, Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library Kit производства New England Biolabs (США). В наборах Ph.D.-7 и Ph.D.-12 фаги несут случайные пептидные фрагменты длиной 7 и 12 аминокислотных остатков (а.о.) соответственно, кодируемые в одной рамке считывания с минорным белком оболочки рIII фага М13. В библиотеке Ph.D.-C7C рандомизированный пептидный фрагмент фланкирован по обоим концам цистеинами, в результате чего экспонируется в виде петли. Моноклональные антитела человека VRC01, Z13e1 и IgG1b12 были получены в рамках программы NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Пептиды, входящие в состав отобранных фаготопов, были синтезированы компанией GenScript (США) с чистотой >80 %, без введения N- и C-концевых модификаций. Плазмиды, необходимые для получения env-псевдотипированных частиц ВИЧ-1, также были получены в рамках программы NIH AIDS Reagent Program.

Аффинная селекция пептидов, специфично взаимодействующих с bnAbs Z13e1, VRC01 и IgG1b12, проводилась по схеме, описанной в руководстве New England Biolabs. Секвенирование фаговых ДНК в области встраивания рандомизированных олигонуклеотидов проводилось в ЦКП «Геномика» СО РАН. На основе результатов секвенирования определялись аминокислотные последовательности пептидов, экспонированных на поверхности отобранных бактериофагов. Специфичность их связывания с bnAbs подтверждали с помощью дот-блот анализа. Для выравнивания аминокислотных последовательностей, а также поиска гомологий между а.о. пептидов и гликопротеинов ВИЧ-1 использовались программы BioEdit, Clustalw2, Pepitope и PdMap. Способность потенциальных пептидов-миметиков конкурировать с ВИЧ-1 за связывание с bnAbs определялась путем постановки реакции конкурентного ингибирования. Для построения предполагаемых моделей взаимодействия

комплексов пептид–антитело–эпитоп применялся метод молекулярного докинга. Для изучения иммуногенных свойств потенциальных пептидов-миметиков фаготопами, экспонирующими данные пептиды, иммунизировались лабораторные животные; их сыворотки проверялись в вестерн-блот анализе, а также путем постановки реакции вируснейтрализации с использованием env-псевдотипированных частиц ВИЧ-1.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

После проведения трех раундов селекции из 12-мерной библиотеки для дальнейшего анализа было взято 40 бактериофагов, из 7-мерной – 45. Обе выборки превосходят указанное в руководстве производителем фаговых библиотек число в 10-20 клонов, которое обычно считается достаточным для определения консенсусного мотива. Из отобранных фагов выделялась одноцепочечная ДНК, затем производилось ее секвенирование в районе встройки рандомизированного олигонуклеотида.

По результатам секвенирования определялись последовательности аминокислотных остатков, входящих в состав найденных пептидов. После этого проводился сравнительный анализ выбранных последовательностей для того, чтобы избежать многократного анализа повторяющихся клонов, а также исключить те из них, которые содержат мотивы, обуславливающие неспецифическую сорбцию ("Plastic binders", или "PB-клоны"). Последовательности пептидов, не вошедших в группу PB-клонов, были выровнены с помощью программы Clustalw2 с целью идентификации консенсусного мотива (таблица 1).

При сравнении последовательностей 12-мерных пептидов был обнаружен консенсусный мотив вида NxxDIT. Из литературных данных известно, что моноклональное антитело (МКА) Z13e1 узнает линейный фрагмент вида WASLWNWFDITN на поверхности внешнего мембранно-проксимального участка (MPER) гликопротеина gp41. При этом ключевую роль в связывании Z13e1 с пептидом играют аминокислотные остатки N₆₇₁ и D₆₇₄. В обнаруженном мотиве NxxDIT присутствуют оба этих остатка, также разделенных двумя аминокислотами. Исключением является пептид SSWLDYHDLTNM, в котором вместо аспарагина в консенсусном мотиве присутствует противоположная по заряду аспарагиновая

кислота. Тем не менее, данный пептид специфически взаимодействует с Z13e1 в дот-блоте. По-видимому, замена заряда каким-то образом компенсируется другими остатками, входящими в его состав. Среди 7-членных пептидов какой-либо общий мотив не выявляется, несмотря на то, что представительность 7- и 12-мерной библиотек не отличалась ($\sim 10^9$ индивидуальных фаговых клонов).

Таблица 1.

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

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

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

Специфичность связывания полученных бактериофагов с bnAb Z13e1 подтверждали с помощью дот-блот анализа. В эксперименте анализировались только те клоны, в состав которых входят различные по аминокислотному составу пептиды. Результаты взаимодействия фаговых клонов, отобранных из 12-мерной библиотеки, приведены на рис. 1. Аналогичная проверка фагов, отобранных из библиотеки Ph.D-7,

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

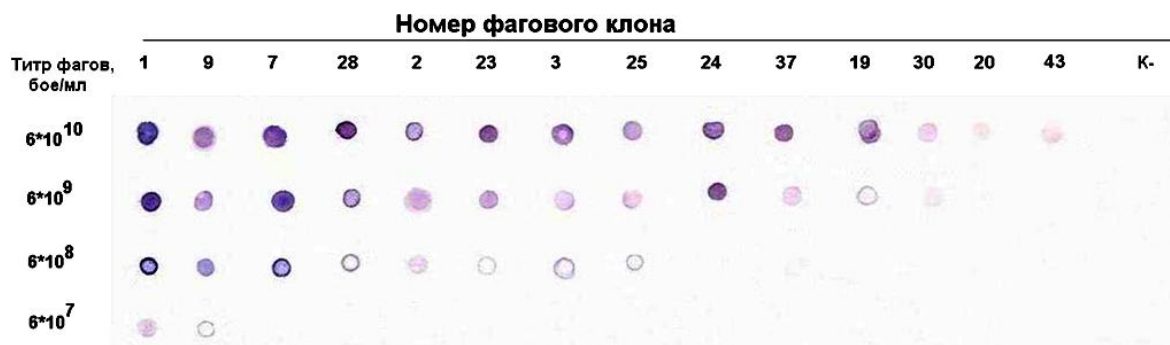


Рис. 1. Дот-блот-гибридизация исследуемых фаговых клонов с антителами Z13e1. На нитроцеллюлозную мембрану наносили последовательные десятикратные разведения фаговых частиц. В качестве отрицательного контроля (К-) был использован бактериофаг, не содержащий искусственную пептидную вставку. Титр бактериофагов указан в бое/мл. На рисунке не представлены результаты анализа клонов, для которых специфического взаимодействия с bnAb z13e1 обнаружено не было

Дальнейший анализ результатов показал, что бактериофаги, продемонстрировавшие в дот-блоте максимальные сигналы, экспонируют пептиды, среди которых выявляется консенсусный мотив вида $NW/Y_{F/XDI_{L/V}}T$ (где X обозначает присутствие в цепи любого а.о., а символы, написанные через наклонную черту, указывают на присутствие в конкретной позиции одного из перечисленных остатков). Выделенный консенсус по ряду ключевых позиций имеет большое структурное сходство с эпитопом gr41, узнаваемым Z13e1. В первую очередь это N_{671} , D_{674} и T_{676} . В позиции I_{675} обнаруживаются также L и V. Известно, что обе эти аминокислоты имеют сходные с I алифатические радикалы и относятся к одной и той же группе. Что касается W_{672} , то в аналогичной позиции среди отобранных пептидов, помимо остатка триптофана, обнаруживаются фенилаланин или тирозин, радикалы которых также являются ароматическими.

Таким образом, отобранные последовательности имеют высокую гомологию с эпитопом gr41, что говорит об успешном использовании библиотеки Ph.D-12 для решения поставленной задачи.

Иммуногенные свойства отобранных пептидов в составе бактериофагов

Бактериофагами, продемонстрировавшими максимальные сигналы в дот-блот анализе, были иммунизированы лабораторные животные. Кроликам под номерами **1** и **2** подкожно вводились суспензии образцов **фага № 1**, несущего на своей поверхности пептид WTKDHNYLDITV, и **№ 9** (экспонирует пептид EWTNWLDITNLA). Контрольный кролик **№ 3** был иммунизирован бактериофагом M13, не содержащим пептидной вставки.

Вируснейтрализующую активность антисывороток определяли с использованием псевдовирюсов. Схема эксперимента представлена на рис. 2.

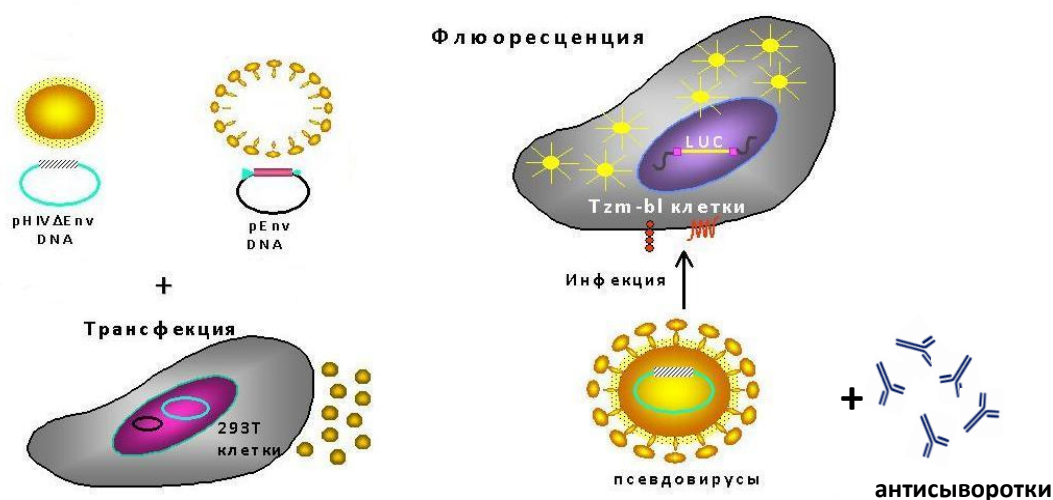


Рис. 2. Тест вируснейтрализации. Рисунок взят из работы Осаки и др. (Ozaki et. al., 2012). Env-псевдотипированные вирусные частицы получали путем котрансфекции "скелетной" (backbone) плазмиды, содержащей полный геном ВИЧ-1 за исключением гена env, и векторов, несущих кассету env/rev ВИЧ-1 различных субтипов. Для инфицирования использовалась клеточная линия Tzm-bl, содержащая рецептор CD4 и корецепторы CCR5 и CXCR4, а также репортерный ген люциферазы, который активируется при попадании белков ВИЧ-1 в цитоплазму. Экспрессия активированного гена люциферазы в инфицированных клетках детектировалась с помощью люминометра

Использовалась панель псевдовирюсных частиц, полученных на основе штаммов ВИЧ-1 субтипов А, В и AG. Реакцию вируснейтрализации проводили с последовательными разведениями иммунных сывороток (в диапазоне от 1:40 до 1:625000), забор которых производился через неделю после третьей иммунизации. Уровень люминесцентного сигнала выражался в RLU (относительные единицы люминесценции). Для каждого штамма псевдовирюсов проводилось три параллельных ряда измерений; из значений люминесценции вычитался фоновый сигнал, регистрируемый в отсутствие псевдовирюсов. Полученные данные

логарифмировались, далее вычислялось среднее арифметическое значение. Распределения полученных значений люминесценции представлены на рис. 3.

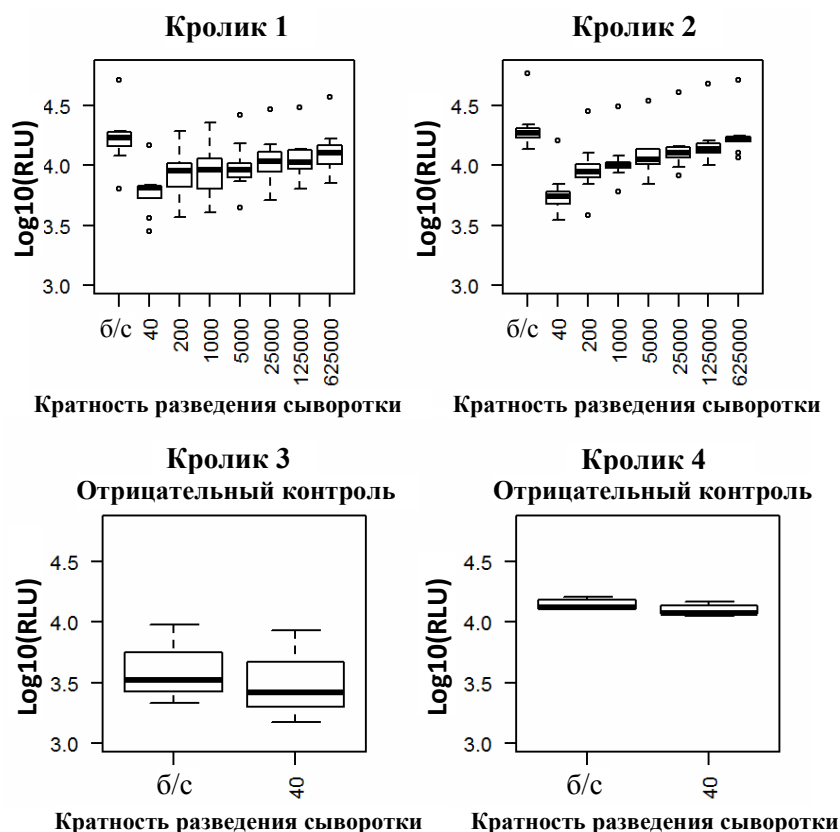


Рис. 3. Распределение значений люминесценции, полученных при постановке вируснейтрализации с использованием различных концентраций сывороток экспериментальных животных. Кролики №3 и №4 – отрицательный контроль, были иммунизированы бактериофагом M13, не содержащим рандомизированной встройки; б/с – отсутствие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

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

Для обработки данных использовался многофакторный регрессионный анализ, производившийся с использованием программы **R**. Было создано несколько моделей, включающих в разных комбинациях такие факторы как *штамм вируса*, *субтип*, *титр сыворотки*, *индивидуальные особенности животного* и *антиген*. Затем с помощью информационного критерия Акаике был произведен отбор факторов и выбрана наилучшая модель. По результатам анализа было установлено, что, несмотря на значительное влияние индивидуальных особенностей животных на эффективность

нейтрализации, наблюдается достоверное дозозависимое снижение инфекционности под действием антисывороток по сравнению с контрольной.

Помимо кроликов, бактериофагами № 1 и № 9 были иммунизированы также и мыши. Иммунизировали две группы животных (самцов мышей линии BALB/c); после третьей иммунизации проводили анализ антисывороток с помощью вестерн-блота. Было показано, что в сыворотках мышей, иммунизированных бактериофагами № 1 и № 9, определяются антитела, специфично взаимодействующие с белком gp41 ВИЧ-1 (рис. 4, дорожки 2 и 3). Таким образом, при селекции 12-мерной библиотеки был обнаружен ряд клонов, содержащих общий консенсусный мотив, который имеет очевидное сходство с аминокислотными последовательностями, обнаруженными в работах других авторов, хотя и не в точности копирует их. Анализ антигенных и иммуногенных свойств полученных фаговых клонов подтверждает, что входящие в их состав пептиды способны имитировать антигенную детерминанту, узнаваемую bnAb Z13e1

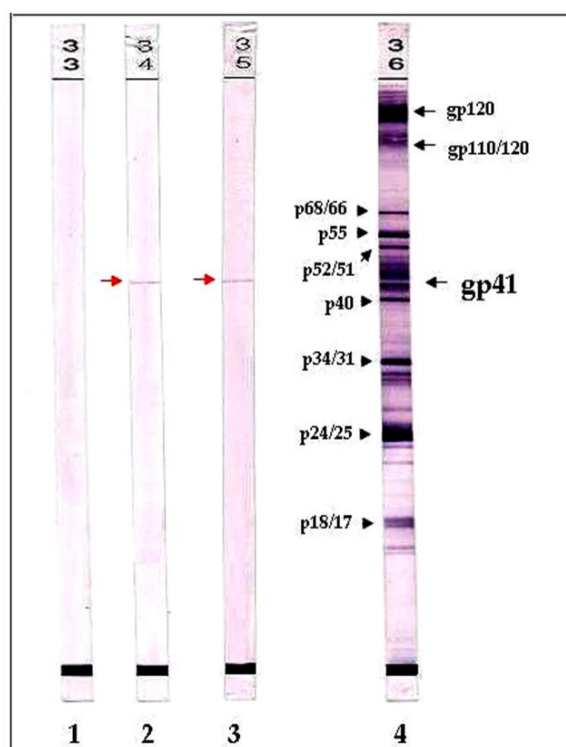


Рис. 4. Специфическая активность сывороток иммунизированных животных с помощью тест-системы NewLav Blot 1. **1** – сыворотка мышей, иммунизированных бактериофагом без встройки (отрицательный контроль); **2** – бактериофагом № 9 (пептид-имитатор EWTNWLDITNLA); **3** – бактериофагом № 1 (пептид-имитатор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

Результаты аффинной селекции и анализ фаговых клонов, селектированных с использованием моноклональных антител IgG1b12

IgG1b12 является одним из первых открытых нейтрализующих антител широкого спектра действия. Узнаваемый им эпитоп перекрывается с последовательностью CD4bs gp120 ВИЧ-1 и сформирован дискретным набором а.о. Поэтому при проведении аффинной селекции с использованием данных антител дополнительно использовалась "кольцевая" библиотека Ph.D-C7C. Производитель рекомендует использовать этот набор, если в качестве молекулы-мишени используется антитело, узнающее конформационный эпитоп (например, располагающийся в контексте поверхностных петель).

После проведения трех раундов селекции для дальнейшего анализа из каждой обогащенной библиотеки произвольно было взято по 60 фаговых клонов. Среди пептидов, экспонируемых на поверхности исследуемых бактериофагов, не было обнаружено сколько-нибудь протяженных мотивов. Кроме того, существенная часть пептидов имела гомологию с РВ-клонами, которые являются результатом неспецифического отбора на пластик иммунологических планшетов.

Для проверки специфичности связывания отобранных бактериофагов с bnAb IgG1b12 использовался дот-блот анализ. В зависимости от интенсивности окраски спотов на нитроцеллюлозной мембране им присваивалось соответствующее обозначение: символ ++++ обозначает самые яркие пятна; +- соответствует спотам с наименьшей интенсивностью окраски; прочерк обозначает отсутствие сигнала.

Наиболее сильный сигнал продемонстрировали фаги № 2 и № 33, экспонирующие 7-мерные кольцевые пептиды. Положительные клоны (№№ 1, 8, 9, 11, 19, 21, 39) из 12-мерной библиотеки дали значительно менее интенсивные сигналы (см. таблицу 2). Во всех остальных случаях фаговые частицы с IgG1b12 не взаимодействовали.

Пептиды, обнаруженные в результате скрининга фаговых библиотек Ph.D-12 и Ph.D-C7C, были синтезированы и проверены в тесте вируснейтрализации на способность связываться с bnAb IgG1b12 и ингибировать его вируснейтрализующую активность. Список синтезированных пептидов представлен в таблице 3. Эксперимент выполнялся по схеме, приведенной на рис. 5.

Таблица 2.

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

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

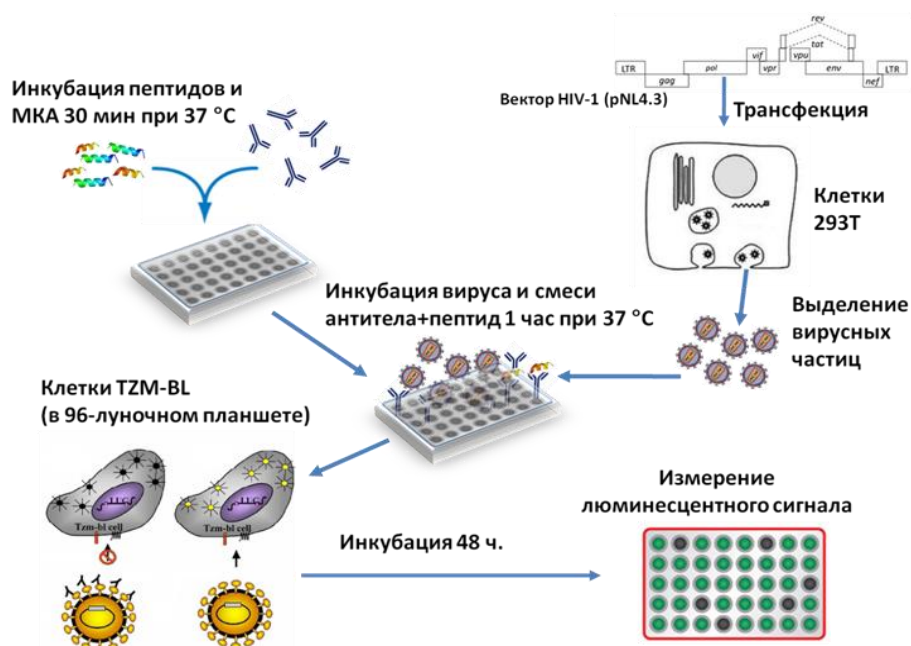


Рис. 5. Схема постановки эксперимента по оценке способности отобранных пептидов связываться с МКА и ингибировать его вируснейтрализующую активность. Эффективность нейтрализации связана обратной зависимостью с уровнем люминесценции в ячейках планшета, в которые вносятся клетки TZM-bl, инфицируемые ВИЧ-1. Предварительно вирусные частицы получают путем трансфекции клеток 293Т плазмидным вектором, кодирующим геном вируса. Синтез люциферазы в клетках TZM-bl запускается при попадании в цитоплазму белка ТАТ ВИЧ-1. При полной нейтрализации антителами уровень люминесценции снижается до фонового уровня. При добавлении пептида-миметика происходит блокировка антител, вследствие чего увеличивается количество вирусных частиц, способных к заражению. Соответственно, возрастает люминесцентный сигнал

Список синтезированных пептидов

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

В тех случаях, когда пептиды хорошо растворялись в водных системах, рабочие концентрации составляли 1 мг/мл. Для растворения гидрофобных пептидов использовались органические растворители. В этих случаях рабочие растворы приходилось разбавлять водой для достижения физиологически допустимых значений органических добавок (~1%), в результате чего концентрации пептидов существенно понижались.

В ходе опыта было обнаружено, что пептид A7 (фаговый клон № 48) продемонстрировал статистически значимое ингибирующее влияние на нейтрализующую активность антител (рис. 6).

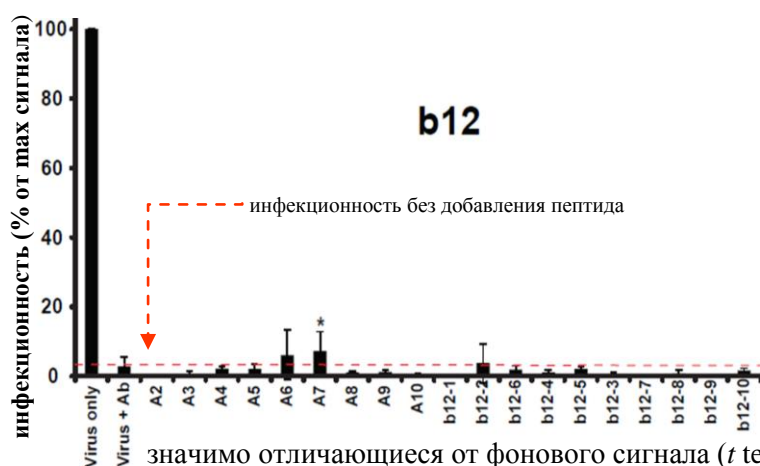


Рис. 6. Ингибирование нейтрализующей активности bnAb IgG1b12 в реакции вируснейтрализации с использованием синтезированных пептидов. За 100 % принято показание люминесценции, производимое вирусом без добавления антител и пептидов. Красной пунктирной линией обозначен уровень сигнала, производимый вирусом с добавлением антител без пептидов (отрицательный контроль). Символом * обозначены значения люминесценции, статистически

Иммуногенные свойства отобранных пептидов в составе бактериофагов

Исходя из приведенных выше рассуждений, для проверки иммуногенных свойств потенциальных фаготопов были выбраны клоны, продемонстрировавшие наилучшие результаты хотя бы в одном из выше описанных тестов. Таким образом, для последующей иммунизации мышей использовались клоны №№ 48 (из библиотеки Ph.D-12), 2, 5 и 33 (Ph.D-C7C), несущие, соответственно, пептиды A7, b12-1, b12-2 и b12-3. Контрольной группе вводилась суспензия бактериофага M13, не содержащего рандомизированной пептидной вставки.

Антисыворотки проверяли в тесте вируснейтрализации с использованием псевдовирусов, полученных на основе штаммов QH0692.42 и PVO.4 ВИЧ-1. Штамм QH0692.42 относится к группе среднеустойчивых к нейтрализующему действию bnAb IgG1b12, в то время как PVO.4 обладает повышенной устойчивостью к действию этих антител. Результаты представлены в таблице 4 в виде значений IC₅₀, рассчитанных путем обработки данных интенсивности люминесценции методом пробит-регрессии.

Эксперименты показали, что одна из антисывороток, полученная после иммунизации мышей бактериофагом № 2, вызывает заметное снижение люминесцентного сигнала в тесте вируснейтрализации по сравнению с сывороткой контрольных животных, иммунизированных контрольным фагом (таблица 4). В таблицу 5 не включены результаты анализа антисывороток, полученных после иммунизации животных фагами № 48, 5 и 33, поскольку для них не было получено заметного превышения сигнала.

Таблица 4.

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

Клон Env	IC ₅₀ в клетках TZM-bl, мкг/мл общих IgG1 ¹		
	Фаг № 2	Фаг M13 (отрицательный контроль)	МКА IgG1b12 ³
QH0692.42	228 (83; 380) ²	894 (472; 2380)	1,0
PVO.4	448 (259; 997)	2627 (1366; 6796)	>50

1 – значение IC₅₀ выражено в концентрации антител (мкг/мл), при которой происходит снижение люминесцентного сигнала на 50%. 2 – цифры в скобках обозначают соответствующий доверительный интервал при $p=0,05$. 3 – значения взяты из литературных данных (Wu. et al., 2009)

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

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

Эпитоп, узнаваемый VRC01, перекрывается с областью CD4bs gp120 ВИЧ-1 и также является конформационным. Поэтому аффинная селекция с использованием данных антител проводилась со всеми тремя библиотеками, включая кольцевую. После проведения биопэннинга из 12-мерной библиотеки было взято 130 фаговых клонов и по 60 фагов из 7-мерных библиотек, ДНК отобранных клонов была секвенирована. По результатам анализа было проведено выравнивание аминокислотных последовательностей (таблица 5).

Было показано, что среди пептидов, отобранных из разных библиотек, гомологичных последовательностей нет. Среди фагов внутри библиотек Ph.D-12 и Ph.D-C7C удалось обнаружить мотивы длиной 5 и 3 а.о. соответственно. При этом большинство фаговых клонов, отобранных из библиотеки Ph.D-12, экспонировали пептиды, имеющие вид **UOxxJUxxWxxx**, где **X** – любой аминокислотный остаток, **U** – гидрофобный неароматический (**L**, **I** либо **V**), **O** – **S** либо **T**, **J** – отрицательно заряженный (**N** либо **E**). "Кольцевые" 7-мерные пептиды имеют более разнородный состав, общий мотив выглядит следующим образом: **xWxL_{F/Y}xxF_Y**.

Специфичность связывания выделенных бактериофагов с МКА подтверждалась с помощью дот-блот анализа. Для дальнейших экспериментов были выбраны те из них, которые продемонстрировали специфические сигналы.

Таблица 5.

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

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

***Примечание:** В таблице не представлены данные селекции из 7-мерной линейной библиотеки, поскольку среди выявленных пептидных последовательностей значимого консенсуса обнаружено не было. Цветом выделены гомологичные аминокислотные остатки

Компьютерный анализ аминокислотных последовательностей пептидов, взаимодействующих с bnAb VRC01

Чтобы выявить а.о., за счет которых отобранные пептиды способны взаимодействовать с VRC01, использовался метод компьютерного моделирования. Был проведен независимый анализ выборки 12- и 7-мерных (кольцевых) пептидов, входящих в состав фагов, показавших наиболее интенсивные сигналы в дот-блоте. Их последовательности сопоставили с фрагментом гликопротеина gp120 ВИЧ-1 в районе контакта с VRC01. Для этого использовалась программа pdMap. Функционально она сходна с приложением Pepitope, применяемым при картировании конформационных эпитопов методом фагового дисплея. Однако в отличие от последней, pdMap позволяет производить поиск гомологий в заданном участке белковой молекулы, а не на всей ее поверхности, что потенциально может обеспечить более точные

результаты. Данные о структуре комплекса VRC01–gp120 были взяты из литературных источников. В результате с помощью pdMap удалось найти соответствие консенсусной последовательности 12-мерных линейных пептидов участку gp120 в районе CD4-связывающей петли. Поиск соответствующего района gp120 был изначально ограничен остатками, входящими в состав эпитопа VRC01. На рис. 7 показано выравнивание фрагмента gp120 с пептидами из клонов, взаимодействие которых с VRC01 было подтверждено методом иммуноблотинга. Как уже отмечалось, консенсусный мотив среди 12-мерных пептидов имеет вид **UOxxJUxxWxxx**.

В то же время в литературе отмечено, что в число пяти ключевых остатков, вносящих наибольший вклад в связывание gp120 с VRC01, входят D³⁶⁸ и I³⁷¹. В найденной консенсусной последовательности этим остаткам соответствуют **J** (D/E) и **U** (L/I/V), имеющие схожие физико-химические параметры и аналогичным образом расположенные друг относительно друга.

E1	---VSWPE---LYKWTWS-	C4	CEWSLWSFC---
E2	---ITAPE---LYAWFGS-	C23	CTWTLLSFC---
E3	---LTWGE---MHTWTVQ-	C1	CSWTLLGFC---
E4	---LTMEE---LTRWSVY-	C9	CSWNLMGFC---
E5	---ITLPE---LHAWKEN-	C19	CTWSLSGFC---
E6	---ITIQE---ITAWPES-	C2	CIWEFWKYC---
E8	---ITNAE---LTNWNNG-	C3	CNWEFWKYC---
E7	---LTNQE---LLTWTAY-	C11	CQWTYYNFC---
E9	---MDLAE---LSNWPFA-	C12	CEWRWEYFC---
E10	---TTFD---ILDYWTSN	C15	CNWEFWKYC---
E11	---LSIAD---LYRWNTS-	cons	-XWXXXXF----
E13	---ITTSE---LYNWRDT-	gp120	-PSGGDLEITMH----
E17	---LTRLLE---LLEWDSP-		
E18	---LSWEE---LLRWASP-		
E19	---LTHTE---LLHWNGM-		
cons	---UOxxJU---UxxWxxx-		
gp120	---PSGGDLEITMH----		

Рис. 7. Выравнивание пептидов из клонов, имеющих наибольшее сродство к МКА VRC01 и фрагмента 365-371 gp120 ВИЧ-1 (его аминокислотная последовательность расположена внизу рисунка). Цветом выделены а.о., соответствующие консенсусной последовательности. Консенсусный мотив обозначен словом «cons»

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

Оценка способности отобранных фаготов конкурировать с МКА VRC01 за связывание с узнаваемым им эпитопом

Пептиды, полученные в результате скрининга фаговых библиотек Ph.D-12 и Ph.D-C7C, были синтезированы и проверены в тесте вируснейтрализации на

способность конкурировать с ВИЧ-1 за связывание с МКА VRC01. Использовали два разведения пептидов с концентрациями 1 мг/мл и 0,2 мг/мл; при этом количественное соотношение антитело/пептид составляло 1:5000 и 1:1000, соответственно. В ходе опыта было обнаружено, что 9 из 44 пептидов продемонстрировали статистически значимое ингибирующее влияние на нейтрализующую активность антител (таблица 7).

Таблица 7.

Пептиды, показавшие наиболее высокую способность ингибировать нейтрализующую активность bnAb VRC01

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

Обращает на себя внимание тот факт, что не все из этих пептидов продемонстрировали зависимость доза-эффект (см. рис. 8). В частности, для пептидов E1, E10 и E11 уровень инфекционности ВИЧ-1 возрастал при уменьшении их концентрации. Возможно, при высоких концентрациях указанных пептидов сказывался ингибирующий эффект органических добавок, используемых для их растворения.

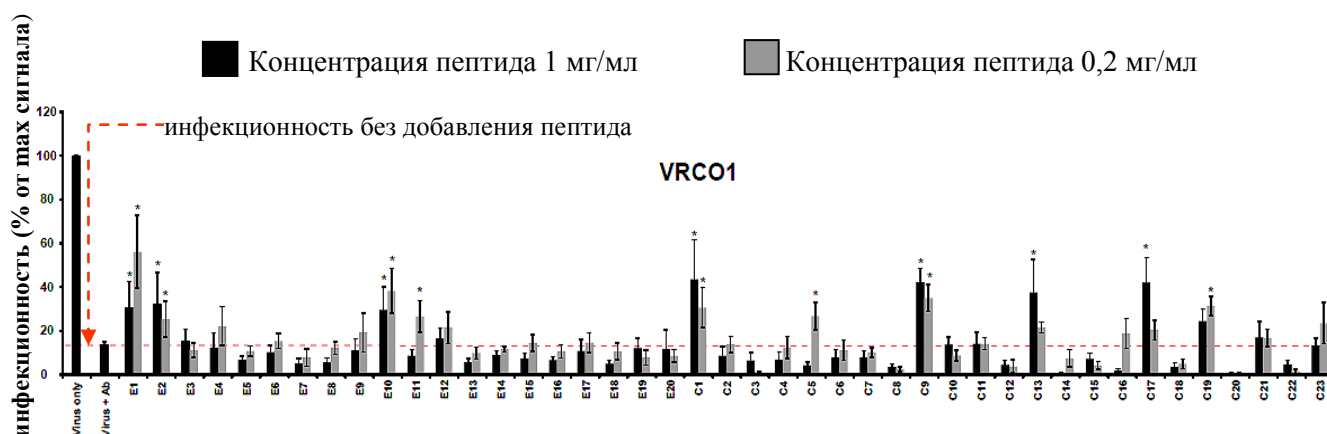


Рис 8. Ингибирование нейтрализующей активности МКА VRC01 в реакции вируснейтрализации с использованием синтезированных пептидов. За 100 % принято показание люминесценции, производимое вирусом без добавления антител и пептидов. Красной пунктирной линией обозначен уровень сигнала, производимый вирусом с добавлением антител без пептидов (отрицательный контроль). Символом * обозначены значения люминесценции, статистически значимо отличающиеся от отрицательного контроля (t test; $P < 0,05$)

Кроме того, была проверена способность пептидов E1 и C1 (как наиболее перспективных) конкурировать с ВИЧ-1 за связывание с IgG1b12 для того чтобы убедиться, что данные пептиды специфически подавляют нейтрализующую активность антитела VRC01. С обоими антителами было проведено 6 независимых экспериментов по заражению клеток смесью вирус–антитело–пептид. Как видно на рис. 9, использование VRC01 приводило к восстановлению инфекционности вируса, с b12 уровень инфекционности незначительно отличался от значения отрицательного контроля. Этот результат свидетельствует о том, что пептиды E1 и C1 специфично связываются с bnAb VRC01, блокируя его нейтрализующую активность.

Следует отметить, что не всегда пептиды, демонстрировавшие сигнал в дот-блоте (находясь в составе бактериофагов), обладали также способностью конкурировать с нативным белком ВИЧ за связывание с антителами. Вероятно, это связано с аминокислотным окружением, в контексте которого находится пептид в составе бактериофага. Также данный эффект может быть связан с тем, что не все свободные пептиды обладали достаточной растворимостью.

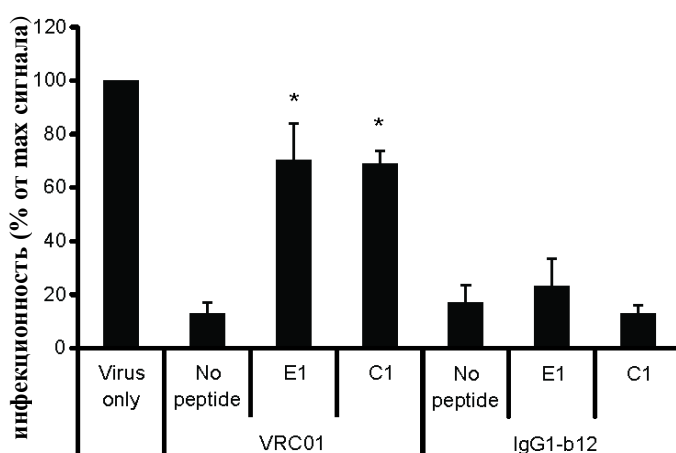


Рис. 9. Реакция конкурентного ингибирования нейтрализующей активности антител VRC01 и IgG1b12 пептидами E1 и C1. За 100 % принято показание люминесценции, производимое вирусом без добавления антител и пептидов. Для оценки фонового сигнала люциферазная активность вируса была измерена при добавлении в реакцию антител VRC01 (IC₉₀ = 6,26 мкг / мл) и IgG1b12 (IC₉₀ = 12,5 мкг/мл), но в отсутствие пептидов. Символом * обозначены значения, статистически значимо отличающиеся от отрицательного контроля (*t* test; *P* < 0,05)

Модель взаимодействия комплекса VRC01-gr120 и пептидов, входящих в состав селектированных бактериофагов

Для проверки соответствия структуры отобранных пептидов фрагменту gr120 в области эпитопа, узнаваемого антителом VCR01, были построены компьютерные модели с использованием метода молекулярного докинга. В этих моделях проверялась возможность перекрывания фрагментов пептидов, продемонстрировавших в конкурентном ингибировании наилучшие результаты, с

комплексом VRC01–gp120. Оказалось, что фрагменты пептидов E1 (SWPEL), E2 (TAPEL), E10 (TTFDI) и E11 (SIADL) способны имитировать район 365-371 gp120 без каких-либо стерических препятствий (рис. 10). Аналогичную модель для пептидов из библиотеки Ph.D-C7C построить не удалось, поскольку не было найдено гомологии между пептидами из данной библиотеки и эпитопом, узнаваемым bnAb VRC01. Вероятно, взаимодействие кольцевых пептидов с VRC01 происходит иным образом. Полученные практические результаты указывают на то, что найденные пептиды по крайней мере частично имитируют фрагмент CD4-связывающей петли.

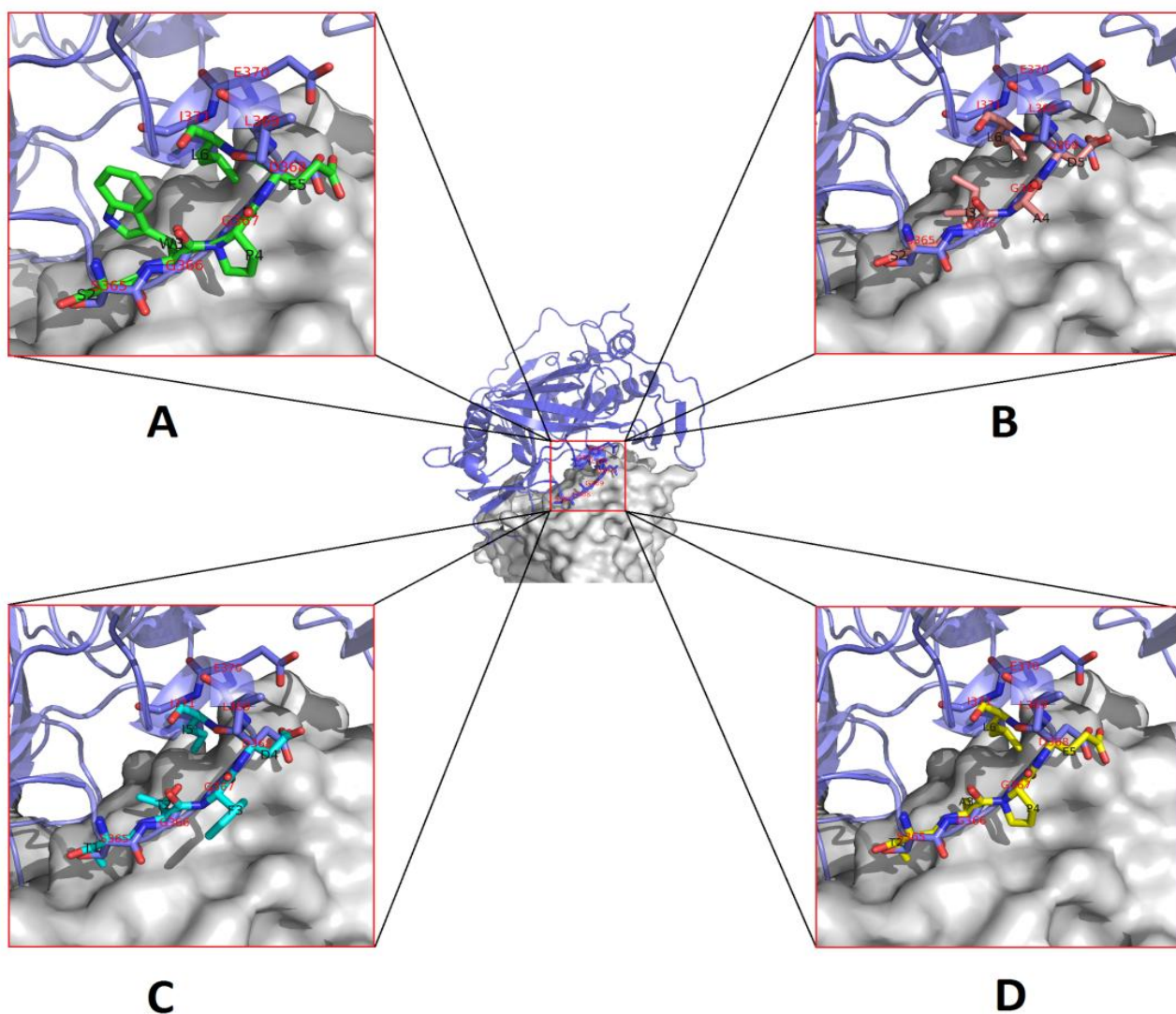


Рис. 10. Модели перекрытия между фрагментами пептидов, продемонстрировавших способность ингибировать нейтрализующую активность bnAb VRC01, и комплексом VRC01–gp120. Антитело изображено в виде поверхности (серый цвет), кристаллическая структура гликопротеина gp120 выделена синим цветом, аминокислотные остатки, входящие в его состав и образующие мотив SGGLEI, обозначены красным, фрагменты пептидов E1 (SWPEL), E2 (TAPEL), E10 (TTFDI) и E11 (SIADL) изображены в виде цветных толстых линий (A, B, C и D соответственно)

Проверка нейтрализующей активности сывороток животных, иммунизированных препаратами бактериофагов

Бактериофаги, экспонирующие пептиды, которые продемонстрировали лучшие результаты в реакции конкурентного ингибирования, были использованы для иммунизации кроликов. Животные под номерами **5** и **6** были иммунизированы смесью фаговых клонов, в состав которых входили пептиды **E1** (VSWPELYKWTWS), **E2** (ITAPELYAWFGS), **C1** (CSWTLLGYC) и **C9** (CSWNLMGFC). Кролика **№ 7** иммунизировали только фагом, экспонирующим пептид **C1**, а кролика **№ 8** – фаготопом, содержащим пептид **E1**. Забор сывороток производился через неделю после третьей иммунизации

Нейтрализующую активность сывороток также проверяли в тесте нейтрализации псевдовирусов. Схема постановки вируснейтрализации аналогична описанной ранее (см. рис. 2). В качестве отрицательного контроля использовались сыворотки кроликов, иммунизированных фагом M13 без пептидной вставки.

Полученные данные также обрабатывались с помощью многофакторного регрессионного анализа. Исходные модели, как и в предыдущем случае, включали такие факторы как *штамм вируса*, *субтип*, *титр сыворотки*, *индивидуальные особенности животного* и *антиген*. С помощью информационного критерия Акаике был произведен отбор факторов и выбрана наилучшая модель. Затем, используя функцию *calc.relimp* из пакета *relaimpo* для **R**, была определена относительная важность каждого из факторов, учтенных в модели. В результате выяснилось, что в данном случае индивидуальные особенности животных оказывают еще большее влияние на нейтрализующую активность сывороток (рис 11).

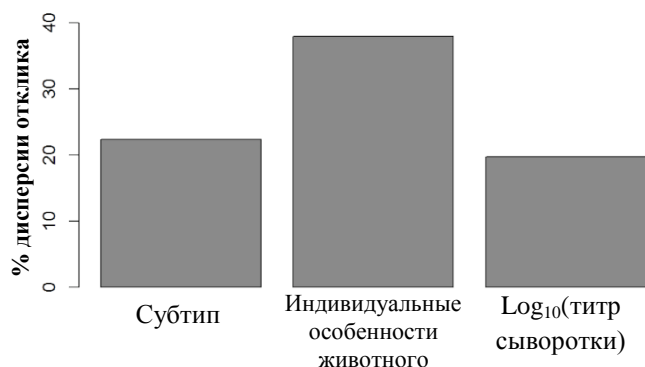


Рис. 11. Относительная значимость факторов в модели, построенной на основе данных анализа сывороток от кроликов, иммунизированных фаготопами, отобранными с использованием bnAb VRC01). На рисунке представлены только независимые факторы

Тем не менее, было также зафиксировано достоверное дозозависимое снижение инфекционности псевдовирусных частиц при использовании опытных сывороток по

сравнению с контрольными. Таким образом, в результате проведения экспериментов по скринингу пептидных 12-мерной и 7-мерной циклической фаговых библиотек против антител VRC01 был найден ряд фаготопов, которые проявляют антигенную активность, по свойствам имитирующую нативный эпитоп исследуемого антитела.

Выводы

1. С помощью аффинной селекции из фаговых библиотек отобраны клоны фагов, которые содержат пептиды, специфично взаимодействующие с моноклональными антителами Z13e1, IgG1b12 и VRC01, обладающими широким спектром вируснейтрализующей активности в отношении ВИЧ-1.

2. Определены структуры рандомизированных пептидов, экспонированных в составе поверхностных белков отобранных фагов. Идентифицированы консенсусные мотивы в аминокислотных последовательностях пептидов, связывающихся с антителами VRC01 и Z13e1.

3. С помощью иммуноблотинга подтверждена специфичность взаимодействия пептидов, выявленных в составе отобранных фагов, с антителами Z13e1, IgG1b12 и VRC01.

4. Выявлены пептиды, способные конкурировать с ВИЧ-1 (NL4-3) за связывание с антителами IgG1b12 и VRC01 в реакции вируснейтрализации.

5. Анализ, проведенный при помощи программного обеспечения pdMap с использованием трехмерной модели комплекса gp120-VRC01-пептид, показал, что отобранные пептиды-имитаторы по крайней мере частично имитируют фрагмент CD4-связывающей петли.

6. Антисыворотки к фагам, содержащим идентифицированные пептиды-миметики эпитопов, узнаваемых антителами Z13e1, IgG1b12 и VRC01, проявляют нейтрализующую активность в отношении псевдовирусов, полученных на основе ВИЧ-1 субтипов A, B и AG.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

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

1. Чикаев А.Н., Щербакова Н.С., Карпенко Л.И., Бажан С.И., Лебедев Л.Р., Ерошкин А.М., Рыжиков А.Б., Ильичев А.А. Разработка искусственных полиэпитопных В-клеточных иммуногенов в качестве вакцин против ВИЧ-1 // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2011. – № 3, ч.1. – С. 229-232.
2. Щербакова Н.С., Чикаев А.Н., Карпенко Л.И., Ильичев А.А. Влияние биотинилирования антител 2F5 на отбор пептидов из комбинаторной фаговой библиотеки // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 2012. – № 1. – С. 20-25.
3. Чикаев А.Н., Пирожкова Д.С., Бакулина А.Ю., Федина Н.В., Карпенко Л.И., Ильичев А.А. Поиск пептидов-имитаторов эпитопов ВИЧ-1, узнаваемых вирус-нейтрализующими антителами VRC01 // Вестник НГУ Серия: Биология, клиническая медицина. – 2013. – № 2. – С. 13-19.
4. Chikaev A.N., Bakulina A.Yu., Burdick R.C., Karpenko L.I., Pathak V.K., Ilyichev A.A. Selection of peptide mimics of HIV-1 epitope recognized by neutralizing antibody VRC01 // PLOS ONE – 2015. – V. 10 – N 3. doi: 10.1371/journal.pone.0120847.

Тезисы на всероссийских и международных конференциях:

1. Chikaev A., Scherbakova N., Tumanova O., Karpenko L., Ilyichev A. Recombinant proteins carrying peptide mimics of HIV-1 // Retrovirology. 2009; 6 (Suppl 3): – P. 333. Published online 2009 October 22. doi: 10.1186/1742-4690-6-S3-P333.
2. Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Козлова Н.С., Ильичева Т.Н., Антонец Д.В., Чикаев А.Н., Бажан С.И. Современные технологии конструирования вакцины против ВИЧ-1, разрабатываемые во ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» // Сборник докладов и материалов «Рабочее совещание по рассмотрению хода выполнения распоряжения правительства Российской Федерации № 1905-р.». – Новосибирск: ЦЭРИС, 2009. – С. 88-92.
3. Чикаев А.Н., Козлова Н.С., Ильичев А.А. Рекомбинантные белки, несущие имитаторы эпитопов ВИЧ-1 // XLVII Международная научная студенческая

- конференция "Студент и научно-технический прогресс", 11-15 апреля 2009 г. Новосибирск, Россия. – С. 151.
4. Щербакова Н.С., Чикаев А.Н., Туманова О.Ю., Карпенко Л.И., Ильичев А.А. Функциональные имитаторы антигенных детерминант ВИЧ-1 для конструирования В-клеточных иммуногенов // III Конференция по вопросам ВИЧ/СПИДа в Восточной Европе и Центральной Азии, 28-30 октября 2009, Москва, Россия. – С. 131.
 5. Chikaev A.N., Shcherbakova N.S., Tumanova O.Y., Ilyichev A.A. Mimics of B-cell epitopes recognized by broadly neutralizing mAb 2g12 for designing HIV-1 vaccine // AIDS Vaccine 2010 (Atlanta, Georgia) abstract book. – 2010. – P. 257.
 6. Ilyichev A., Shcherbakova N., Chikaev A., Karpenko L. Mimics of B-cell epitopes for designing of HIV-1 vaccine candidates // BIT Life sciences 2nd Annual World Vaccine 2010 (Beijing), Abstract book. – P.203.
 7. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Лебедев Л.Р., Каплина О.Н., Щербакова Н.С., Даниленко Е.Д., Даниленко А.В., Чикаев А.Н., Богрянцева М.П., Масычева В.И., Нечаева Е.А., Ильичев А.А. Разработка кандидатных вакцин против ВИЧ/СПИД в ГНЦ ВБ «Вектор» // (17-19 ноября 2010 г., Новосибирск): Сборник трудов. – Новосибирск: ЦЭРИС, 2010. – С. 95-103.
 8. Щербакова Н.С., Карпенко Л.И., Чикаев А.Н., Бажан С.И., Лебедев Л.Р., Ерошкин А.М., Рыжиков А.Б., Ильичев А.А. Полиэпитопный подход для разработки искусственных В-клеточных иммуногенов в качестве ВИЧ-1 вакцин // (17-19 ноября 2010 г., Новосибирск): Сборник трудов. – Новосибирск: ЦЭРИС, 2010. – С. 169-172.
 9. Чикаев А.Н., Щербакова Н.С. Имитаторы конформационного эпитопа ВИЧ-1, узнаваемого МКА 2g12 // Под ред. В.А. Козлова, С.В. Смирновой, В.Т. Манчука – Абакан: Издательство ГОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова», 2011. – С. 177-178.
 10. Чикаев А.Н., Щербакова Н.С., Карпенко Л.И., Бажан С.И., Лебедев Л.Р., Ерошкин А.М., Рыжиков А.Б., Ильичев А.А. Разработка искусственных полиэпитопных В-клеточных иммуногенов в качестве вакцин против ВИЧ-1 // II Межрегиональная научно-практическая конференция молодых ученых «Человек: здоровье и экология», г. Иркутск 15-16 сентября 2011 г. – С. 9.

11. Федина Н.В., Чикаев А.Н. Поиск пептидов-имитаторов, узнаваемых широко нейтрализующими ВИЧ-1 антителами b12 // Теоретические и прикладные проблемы науки и образования в 21 веке. Сборник научных трудов по материалам Международной заочной научно-практической конференции 31 января 2012 г. Тамбов, 2012. – С. 149-150.
12. Чикаев А.Н., Федина Н.В., Карпенко Л.И., Ильичев А.А. Получение имитаторов эпитопов, узнаваемых вирус-нейтрализующими моноклональными антителами b12, Z13e1 и VRC-01, для создания вакцины против ВИЧ-1 // Гигиенические аспекты в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения (Сборник статей, посвященных 90-летию государственной санитарно-эпидемиологической службы РФ). – Новосибирск, 2012. – С. 393-400.
13. Ильичев А.А., Чикаев А.Н., Щербаков Д.Н., Федина Н.В., Бакулина А.Ю., Карпенко Л.И. Использование фаговых пептидных библиотек для изучения эпитопов, узнаваемых нейтрализующими ВИЧ-1 антителами широкого спектра действия Z13e1, VRC03 и VRC01 // В сборнике: «Бактериофаги: Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». Материалы международной научно-практической конференции. Ульяновск, 23-25 апреля, 2013. – Том I. – С. 7-14.
14. А.Ю. Бакулина, А.Н. Чикаев, Н.В. Волкова. Поиск структурного соответствия между гликопротеином ВИЧ gp120 и пептидами-имитаторами, полученными методом фагового дисплея // 1-я Международная конференция молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio», Кольцово, 7 октября 2014 г. – С. 106-108.