

УДК 577.27

Антитела, нейтрализующие широкий спектр изолятов ВИЧ-1, – новая грань иммунной системы

Д. Н. Щербаков^{1,2*}, А. Ю. Бакулина^{1,3}, Л. И. Карпенко¹, А. А. Ильичев¹

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово

²Алтайский государственный университет, 656049, Барнаул, просп. Ленина, 61

³Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

*E-mail: scherbakov_dn@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 02.04.2015

РЕФЕРАТ Вирус иммунодефицита человека-1 (ВИЧ-1) обладает способностью уходить от адаптивного иммунного ответа благодаря высокой скорости мутирования. В первые годы после открытия ВИЧ-1 достаточно широко было распространено мнение, что протективные антитела, нейтрализующие вирус, встречаются редко или их вообще не существует. В 1990-х появились первые сообщения о том, что в сыворотках некоторых ВИЧ-1-инфицированных присутствуют антитела, способные нейтрализовать различные подтипы вируса. Такие антитела получили название широконейтрализующих (broadly neutralizing antibodies, bNAbs). С 2009 года благодаря появлению новых клеточных технологий резко выросло количество публикаций, посвященных получению bNAbs, способных нейтрализовать более 90% первичных изолятов ВИЧ-1. bNAbs отличаются от обычных антител рядом особенностей, а именно высоким уровнем соматических мутаций и необычно протяженными вариабельными петлями, что обеспечивает им возможность связываться с консервативными, но малодоступными районами Env ВИЧ-1. Представленный обзор посвящен описанию широконейтрализующих антител против ВИЧ-1, классифицированных по их взаимодействию с районами уязвимости на поверхности гликопротеинов вируса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ВИЧ-1, gp120, gp41, bNAbs, широконейтрализующие антитела.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека типа 1; СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита; bNAbs – антитела, нейтрализующие широкий спектр изолятов ВИЧ-1; Env – белок оболочки ВИЧ-1; gp – гликопротеин; CD4 – трансмембранный гликопротеин, рецептор ВИЧ-1; CD4bs – участок связывания gp120 с CD4; CCR5 – интегральный мембранный белок, рецептор хемокина типа 5, рецептор ВИЧ-1; CXCR4 – интегральный мембранный белок, рецептор хемокина типа 4, корецептор ВИЧ-1; MPER – membrane-proximal external region, околосмембранный внешний регион белка gp41; RT-PCR – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; CDR – complementarity determining region, область молекулы иммуноглобулина, определяющая ее комплементарность антигену; CDR H3 – третья вариабельная петля района тяжелой цепи антитела, определяющего комплементарность антигену.

ВВЕДЕНИЕ

Одна из важнейших тенденций развития биомедицины последних лет – все увеличивающееся применение препаратов моноклональных антител. Уже более 15 лет в клиниках разных стран препараты направленного действия на основе антител успешно используются против целого ряда социально значимых заболеваний, а общее число таких препаратов достигло уже нескольких десятков. Различным аспектам создания и использования моноклональных антител посвящен ряд обзоров [1, 2]. В то же время многие грани индукции и развития гуморального иммунного ответа

до сих пор не понятны. Изучение широконейтрализующих антител (bNAbs) против ВИЧ-1 значительно расширило наши знания об антителах, но эта область продолжает стремительно развиваться.

Вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), вызывающий СПИД, был открыт более 30 лет назад. По данным ВОЗ, на конец 2013 года почти 78 млн человек заразились ВИЧ-1, около половины из них уже нет в живых. Безопасная и эффективная вакцина против ВИЧ-1 позволила бы приостановить, а впоследствии и ликвидировать распространение этого опасного заболевания. Основное препятствие в разработке

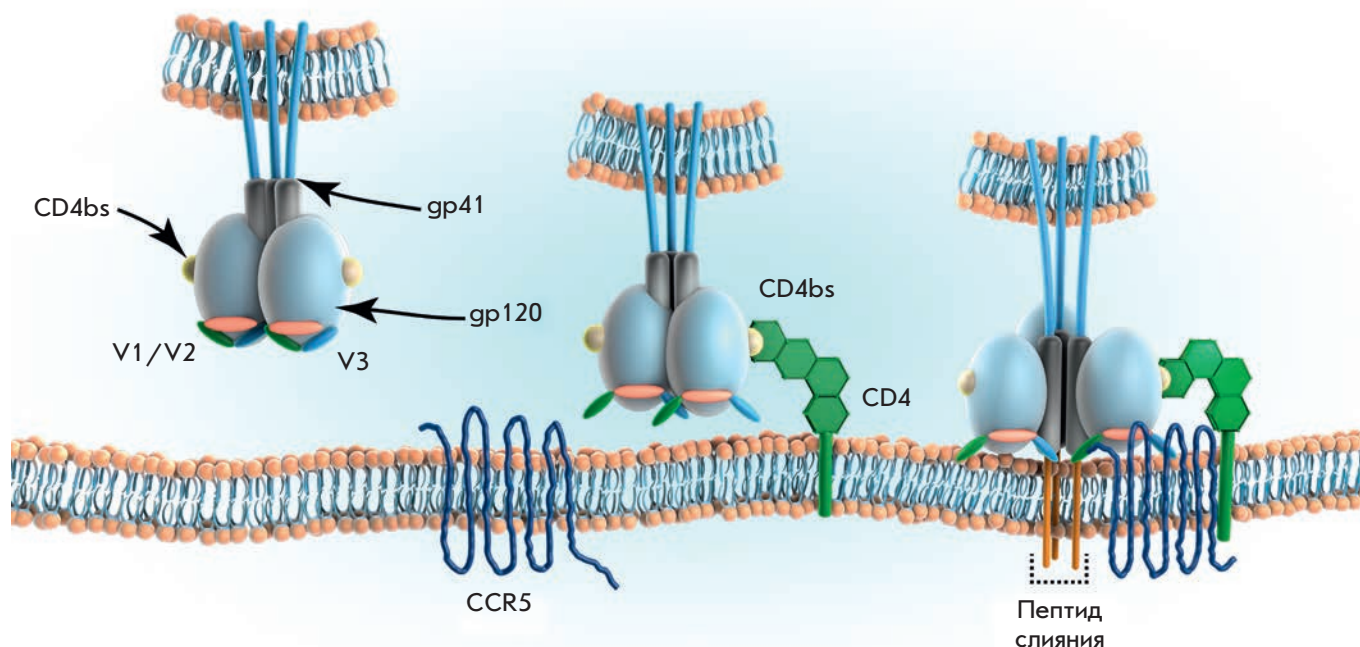


Рис. 1. Этапы взаимодействия тримера Env с клеточной мембраной. Вначале gp120 связывается с клеточным рецептором CD4, в результате открывается сайт связывания корецепторов, прежде экранированный районами V3 и V1/V2. После связывания с CCR5 или другим корецептором пептид слияния проникает в клеточную мембрану

вакцины против ВИЧ-1 – чрезвычайно высокая изменчивость вируса, что позволяет ему уходить от воздействия иммунного ответа. Так, в процессе эпидемии ВИЧ-1 эволюционировал в 9 основных подтипов и их многочисленные рекомбинантные формы [3].

До начала 1990-х годов считалось, что протективные антитела, нейтрализующие столь активно мутирующий вирус, встречаются редко или их вообще не существует. В 90-х появились первые сообщения о том, что сыворотки некоторых ВИЧ-1-инфицированных содержат антитела, способные нейтрализовать различные подтипы вируса. Эти антитела получили название широконейтрализующих (broadly neutralizing antibodies, bNAbs) [4]. С 2009 года благодаря появлению новых клеточных технологий резко возросло количество публикаций, посвященных получению новых bNAbs. В представленном обзоре рассмотрены bNAbs, которые позволяют по-новому взглянуть на стратегию дизайна вакцины против ВИЧ-1.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ВИЧ-1

Вирионы ВИЧ-1 имеют сферическую форму диаметром около 140 нм. Оболочка вируса состоит из двойного слоя липидов и пронизана гликопротеиновыми шипами. Липидная оболочка происходит из плазма-

тической мембраны клетки, в которой реплицируется вирус, а шипы представлены тримерными гликопротеиновыми комплексами, состоящими из гликозилированных белков: внешнего gp120 и трансмембранного gp41. Каждая вирусная частица содержит 70–79 таких тримеров [5]. Из всех вирусных белков только они экспонированы на поверхности вириона и поэтому служат основными мишенями для антител. Они жизненно необходимы для размножения вируса, так как обеспечивают его проникновение в клетку.

Гликопротеины gp120 и gp41 кодируются геном *env*, они называются Env и транслируются в виде единого полипротеина gp160, который тримеризуется, а затем расщепляется фурином клетки в аппарате Гольджи. Расщепление активирует тример gp120–gp41, переводя его в метастабильное состояние, готовое к конформационному переходу. Как и другие вирусные белки слияния типа I, эти тримеры связываются с клеточными рецепторами, вследствие чего претерпевают конформационные изменения, приводящие к высвобождению пептида слияния (fusion peptide) – района gp41, который проникает в клеточную мембрану и обеспечивает слияние мембран вируса и клетки (рис. 1). Известны пространственные структуры как отдельных фрагментов gp120 и gp41, так и тримера в целом; районы взаимодействия с CD4 и корецепторами картированы на gp120 [6].

ВИЧ-1 инфицирует клетки, несущие на своей поверхности рецептор CD4 и хемокиновые рецепторы, состоящие из семи трансмембранных доменов, обычно CCR5 или CXCR4. К таким клеткам относятся Т-хелперные лимфоциты (Th), макрофаги, фолликулярные дендритные клетки, клетки островков Лангерганса, клетки микроглии головного мозга. Вирус также способен инфицировать широкий спектр CD4-негативных клеток, обладающих рецепторами хемокинов: астроциты мозга, эпителий шейки матки, почек и кишечника, эндотелиальные клетки капилляров мозга и шейки матки, клетки роговицы глаза. Без CD4 аффинность связывания вируса с клеткой значительно ниже [7]. Без взаимодействия с корецепторами не происходит слияния мембран вируса и клетки, вирус поглощается клеткой путем эндоцитоза и впоследствии обычно инактивируется, а его генетический материал не попадает в цитоплазму [7].

Благодаря высокой скорости накопления мутаций изменяется аминокислотный состав белков ВИЧ-1. Однако ряд фрагментов в белках, обеспечивающих взаимодействие вируса с CD4 и CCR5, консервативен. На gp120 переменные районы (V1, V2, V3, V4, V5) чередуются с консервативными (C1, C2, C3, C4 и C5). Переменные петли стерически закрывают консервативные районы от взаимодействия с антителами [8]. Показано, что антитела в организме больных нарабатываются, в первую очередь, на переменные районы, и за счет высокой скорости накопления мутаций вирус легко уходит от этих антител [9, 10]. Еще один механизм, с помощью которого вирус скрывается от иммунного ответа, – гликозилирование. Известно, что gp120 имеет около 25 сайтов N-гликозилирования, и углеводы экранируют белковую поверхность комплекса [8]. Мутации вызывают перемещение сайтов гликозилирования gp120, что приводит к изменению антигенного портрета вируса [11]. Вирус, у которого удалили части переменных петель и некоторые сайты гликозилирования, остается жизнеспособным, но он более чувствителен к нейтрализации поликлональной сывороткой. Это заставляет предполагать, что основная функция этих районов – маскировка других районов Env от антител [12]. Учитывая все особенности Env, полагали, что протективные антитела не могут возникнуть в процессе ВИЧ-инфекции.

Действительно, информации об антителах, способных нейтрализовать ВИЧ, в первые годы было очень мало. В связи с тем, что организм человека не способен самостоятельно сдерживать вирусную нагрузку, было принято считать, что такие антитела либо не нарабатываются, либо это происходит крайне редко [18–20]. Позже стали поступать сообщения

о ВИЧ-1-инфицированных, чьи сыворотки содержали антитела, способные нейтрализовать не только лабораторно-адаптированные штаммы, но и различные первичные изоляты вируса [21–26]. Вначале полагали, что такие широконейтрализующие антитела (bNAbs) появляются у небольшой части ВИЧ-инфицированных [20, 27]. В дальнейшем bNAbs выявили примерно у 30% носителей ВИЧ, инфицированных не менее года назад [23, 28, 29]. Совсем недавно показали, что подобные антитела можно зарегистрировать более чем у половины инфицированных [30]. При этом у 1% носителей формируются антитела, обладающие необычно высокой способностью нейтрализовать широкий спектр первичных изолятов, а также до 99% известных на сегодняшний день изолятов ВИЧ-1 [31].

Изучение свойств bNAbs и регионов ВИЧ-1, с которыми они взаимодействуют, позволяет получить не только фундаментальные знания о природе этого уникального явления, но и весьма полезно для исследований, направленных на создание вакцины.

В настоящее время выделяют пять так называемых регионов уязвимости – районов тримера gp41-gp120 ВИЧ, с которыми связываются bNAbs. В каждом из них расположено несколько перекрывающихся эпитопов различных bNAbs. Один из регионов уязвимости совпадает с участком связывания CD4 на gp120 (CD4bs – от английского CD4 binding site). Еще два региона расположены исключительно на gp120 – это район связывания антител PG9 и PG16 и область около петли V3. К таким регионам относятся также область gp41 около мембраны (MPER) и граница gp120 и gp41. Регионы уязвимости схематично изображены на *рис. 2*.

Информация об основных bNAbs представлена в *таблице*, где приведена их классификация согласно регионам связывания и хронологии открытия. Серым цветом в *таблице* выделены антитела, которые относятся к bNAbs первого поколения.

ПЕРВОЕ ПОКОЛЕНИЕ bNAbs

Хронологию открытия нейтрализующих ВИЧ-1-антител широкого спектра действия можно условно разделить на два периода. Первые сообщения об антителах с подобными характеристиками появились в начале 1990-х годов прошлого века. В их число входят IgG1b12, 2G12, 2F5, Z13 и 4E10.

Первым при помощи техники фагового дисплея получили IgG1b12, которое связывается с CD4bs – консервативным районом gp120 [4]. b12 было выделено в виде Fab-фрагмента путем селекции из иммунной фаговой библиотеки антител, полученной из костного мозга ВИЧ-инфицированного нон-прогрессора. Сочетание тяжелой и легкой частей этого антитела

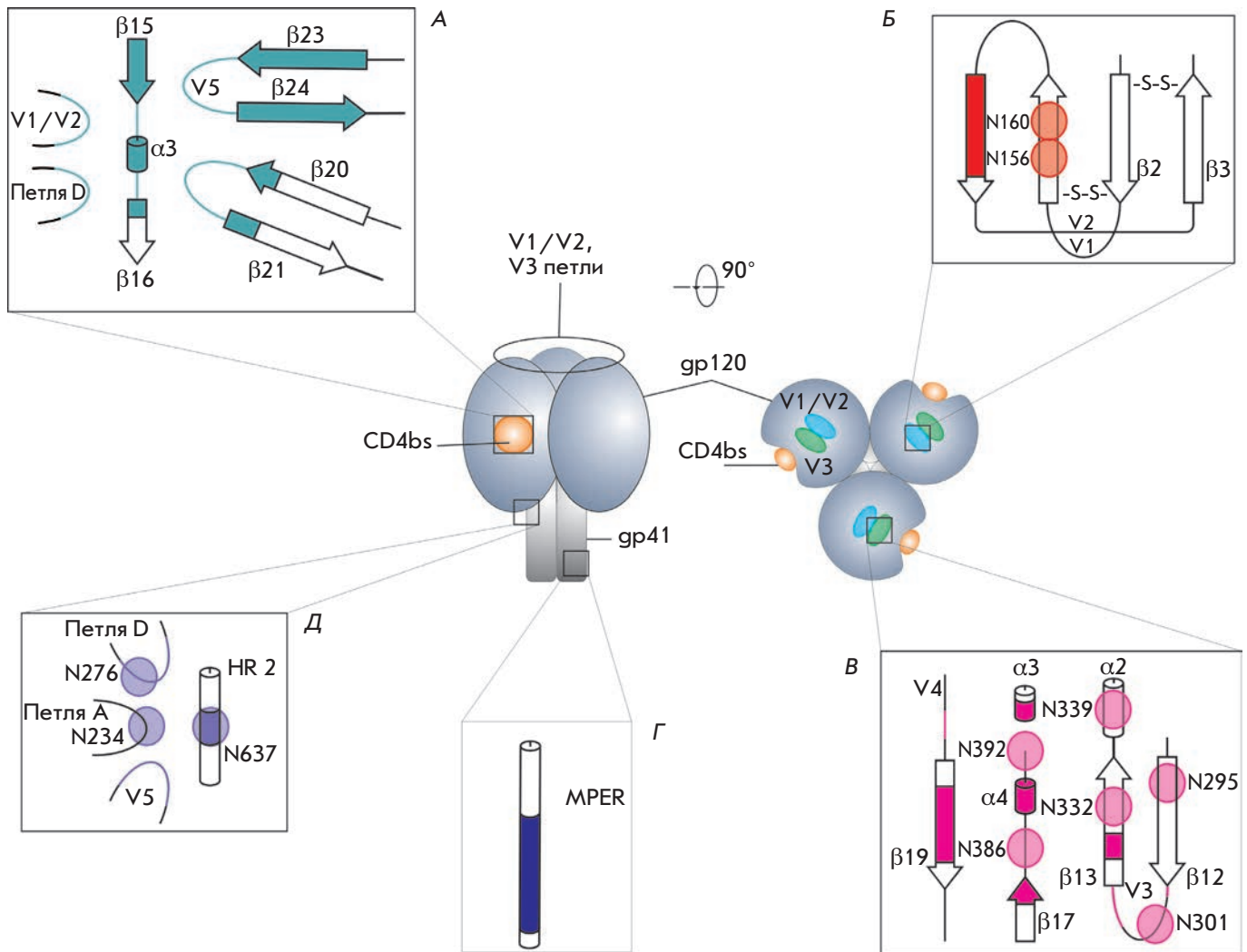


Рис. 2. Схематическое изображение поверхностного тримерного гликопротеинового комплекса ВИЧ-1-Env и регионы его уязвимости, с которыми связываются антитела, нейтрализующие широкий спектр первичных изолятов. α -Спирали обозначены цилиндрами, β -тяжи – стрелками, петли – тонкими линиями, гликозилированные аминокислотные остатки – кругами. Подробная информация об антителах, связывающихся с каждым из регионов, представлена в таблице. **А** – CD4bs, участок gp120, связывающийся с рецептором CD4. Основные структурные элементы, участвующие в связывании с антителами, – петли D и V1/V2, переменная петля V5 и фланкирующие ее β -тяжи 23 и 24, фрагменты β -тяжей 20 и 21, район, включающий β -тяж 15, α -спираль 3 и фрагмент β -тяжа 16. Схема региона построена на основе данных [13]. **Б** – регион, образованный переменной петлей V1/V2. В связывании антител принимает участие участок петли, находящийся в конформации β -складки, а также гликаны, связанные с остатками аспарагина в положении 156 и 160. Схема построена на основе данных [14]. **В** – регион на поверхности gp120. Во взаимодействии с антителами к этому региону могут принимать участие следующие структурные элементы: фрагменты β -тяжей 19, 17, 13, фрагменты переменных петель V3 и V4, α -спирали 4 и 3, а также гликаны в позициях N392, N386, N339, N332, N301, N295. Схема построена на основе данных [15]. **Г** – MPER-регион, линейный район в составе gp41. Во взаимодействии с антителами принимает участие участок области MPER. Схема построена на основе данных [16]. **Д** – регион, включающий фрагменты gp120 и gp41. С антителами взаимодействуют гликозилированный фрагмент gp41 вместе с гликаном в районе аспарагина 637, участки петель V5 и D, а также гликаны в позициях 276 и 234. Схема построена на основе данных [17]

Характеристика широконейтрализующих антител против ВИЧ-1

Регион обло- лочки	Эпитоп (специфичность)	Антитело	Год выде- ления	Ширина нейтрализа- ции, %	Эффектив- ность ней- трализации*, мкг/мл	Длина CDR H3, амино- кислотные остатки	Соматические мутации, % аминокислот- ных замен
gp41 MPER	ELDKWA [18]	2F5**	1992	55–67 [39, 40, 57, 58, 59]	1.44 [40]	24	15.2
	WFD(I/L)(T/S) NW(L/I)WYIK [60]	4E10**	1994	85–100 [36, 39, 57, 58, 61, 62]	1.62 [40]	20	15.6
	SLWNWFDITN [63]	Z13**	2001	35 [62]	40 [62]	19	21
	WNWFDITN [63]	Z13e1**	2007	50 [36]			
	WFDITNWIWYIL/R [57]	10E8	2012	98–99 [40, 57, 58]	0.25 [40]	22	22.1
gp120 CD4bs	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	b12**	1991	35–75 [32, 38, 39, 61]	2.82 [39]	18	17.3
	«Коровый» эпитоп между внутренним и внешним доменом, остатки D474, M475, R476 важны для свя- зывания [64]	HJ16	2010	36 [61]	8.01	21	36.7
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	VRC01	2010	88–93 [38, 40, 44, 45, 51, 57, 58, 65]	0.09 [45] 0.92 [48]	14	38.8
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	VRC02	2010	90–91 [38, 40]	0.13 [40]	14	34.9
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	VRC03	2010	51–59 [38, 40, 58]	0.08 [44]	16	34.9
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	PGV04 (VRC- PG04)	2011	77–88 [40, 44, 46, 51]	0.14 [40]	16	38.2
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	CH31 (VRC- CH31)	2011	84–91 [40, 44, 66]	0.02 [44]	15	31.9
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4- связывающая петля	CH33 (VRC- CH33)	2011	90 [44]	0.24 [44]	15	31.9
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	NIH45-46	2011	84–86 [40, 45, 48]	0.08 [45] 0.41 [48]	18	44
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	45-46 ^{G54W}	2011	92 [48]	0.04 [48]	18	44
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	3BNC117	2011	86–92 [40, 45, 58]	0.06 [40]	12	36.9
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	12A12	2011	92–96 [40, 45]	0.07 [40]	15	34
	Петли D, V1/V2, V5 и CD4-связывающая петля	VRC23	2013	65–80 [40, 58]	0.58 [40]	Нет данных	Нет данных

Вариабельная петля V1/V2 gp120	Гликаны в позиции N160 и N156 и фрагмент β-складки вариабельной петли V1/V2	PG9	2009	77–83 [39, 40, 51, 57, 58]	0.08 [58]	30	15.4
		PG16	2009	73–79 [39, 40, 57, 58]	0.02 [57]	30	16.8
		PGT145	2011	78 [51]	0.29	33	22.8
		CH01	2011	46 [50]	3.75 [50]	24	23.3
Вариабельная петля V3 gp120	Три гликана в позициях N332, 339, 392	2G12	1994	28–39 [39, 40, 61]	1.45 [40]	16	33.6
		PGT121	2011	70 [51]	0.03	26	21.2
		PGT128	2011	72 [51]	0.02	21	27.9
CD4i/V3 gp120	Петля V3	3BC176	2012	64 [67]	12.8 [67]	19	29.4
Регион на стыке gp120 и gp41	Гликан-зависимый эпитоп (комплекс N-гликанов с галактозой на конце в позиции N611 и N637)	PGT151-155	2014	64–66 [56]	0.008–0.012 [56]	28	Нет данных
		8ANC195	2011	67 [45]	0.87 [45]	9	Нет данных

Примечание. Строки, выделенные серым, содержат информацию о bNAbs первого поколения.

* – % нейтрализации подсчитан, исходя из количества нейтрализованных вирусов при IC₅₀ при концентрации антиген ниже 50 мкг/мл.

** – наличие полиреактивности.

было случайным, поэтому в природе такое антитело может не встречаться [32].

Антитело 2G12 взаимодействует с α1→2 маннозными остатками gp120 в районе вариабельных петель V3 и V4 [33] и имеет уникальное строение. Тяжелые цепи этого антитела перекрещиваются, каждая легкая цепь взаимодействует с константным доменом одной тяжелой цепи и вариабельным доменом другой, в результате чего Fab-фрагменты необычно близко примыкают друг к другу. Подобное анти-ВИЧ-антитело выделено только от одного больного. Эпитоп, узнаваемый 2G12, является конформационным, он сильно зависит от гликозилирования остатков аспарагина в C2-, C3-, C4-доменах и петле V4.

bNAbs 2F5 и 4E10 узнают линейные перекрывающиеся фрагменты в области MPER-региона gp41, при этом оба антитела обладают полиреактивностью [34]. Эти антитела способны одним Fab-фрагментом прочно связываться с MPER-регионом, а вторым взаимодействовать с другими антигенами на поверхности ВИЧ, хотя и менее прочно, что и обуславливает их способность нейтрализовать широкий спектр первичных изолятов вируса [34].

Антитело Z13, как и IgG1b12, получено с помощью технологии фагового дисплея. Позже с целью повышения аффинности путем внесения аминокислотных

замен в последовательность паратопа был получен его клональный вариант Z13e1. Это позволило получить антитело, обладающее примерно в 35 раз большей силой связывания, чем исходный вариант [19, 35, 36].

Исследования, выполненные на больших панелях псевдовирюсов различных подтипов, показали, что антитела первого поколения обладают, в целом, умеренной шириной и эффективностью нейтрализации. Для достижения эффективной нейтрализации различных изолятов ВИЧ-1 необходимы смеси этих антител в высокой концентрации, что представляет весьма сложную задачу. В то же время на приматах показано, что использование для пассивной иммунизации смеси нейтрализующих антител b12, 4E10, 2F5 и 2G12 защищает обезьян от инфицирования вирусом SHIV89.6P [37]. Данный факт существенно стимулировал дальнейшие работы по поиску новых bNAbs.

bNAbs ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ

Довольно долгое время попытки получить нейтрализующие антитела с лучшими характеристиками были безрезультатными. Лишь в 2009 году удалось обнаружить bNAbs с более высокой эффективностью и способностью нейтрализовать большее разнообра-

зие первичных изолятов ВИЧ-1. К успеху привело использование комбинации трех стратегий: отбор сывороток хронических больных, содержащих высокоаффинные и кросс-реактивные нейтрализующие антитела; использование новых подходов селекции и скрининга клонов В-клеток; разработка высокопроизводительных методов выделения моноклональных антител человека.

Обнаружение в 2009–2010 году антител VRC01 [38] и PG9/PG16 [39] стало ключевым событием в изучении bNAbs. Эти антитела примечательны тем, что, во-первых, способны нейтрализовать огромное разнообразие первичных изолятов ВИЧ-1, а во-вторых, обладают высокой эффективностью нейтрализации, т.е. концентрации этих антител, обеспечивающие эффективную нейтрализацию вируса, на порядок меньше, чем у антител первого поколения. VRC01, например, способно нейтрализовать до 93%, PG9/PG16 – до 80% первичных изолятов ВИЧ-1, в то время как b12 (bNAbs первого поколения) нейтрализует только 35% [40].

Получение VRC01 стало возможным благодаря специальному подходу, разработанному Дж. Маскола и соавт. [38]. Были сконструированы белки «наживки», представляющие собой рекомбинантные формы стабилизированного gp120 с измененной поверхностью, названные RSC (Resurfaced Stabilized Core). С целью лучшего доступа антител к нужной области в RSC удалены три вариабельные петли, а поверхностные аминокислотные остатки заменены таким образом, чтобы ни одна область gp120, за исключением CD4bs, не распознавалась циркулирующими в организме антителами. Кроме того, для проведения негативной селекции получен вариант Δ RSC, имеющий мутантный участок связывания с CD4. С использованием RSC выявлены сыворотки ВИЧ-положительных пациентов, содержащие антитела к CD4bs. Из их крови выделено более 25 млн В-клеток памяти, которые инкубировали с RSC и Δ RSC, помеченными флуорохромами. Затем при помощи проточного цитофлуориметра-сортера отобрали редко встречающиеся В-лимфоциты, специфичные только к CD4bs. После этого с использованием технологии single-cell RT-PCR [41] получили кДНК, кодирующие легкие и тяжелые цепи антител индивидуальных В-лимфоцитов, которые затем клонировали в специальных векторах экспрессии [38].

Антитела PG9 и PG16 были выделены несколько раньше, чем VRC01. Для поиска этих антител, как и VRC01, использовали авторскую методику [39]. На первом этапе проводили сортировку активированных В-клеток ВИЧ-инфицированных. Проверяли способность антител из этих клеток нейтрализовать первичные изоляты ВИЧ-1 (JR-CSF и SF162) и свя-

зывать рекомбинантные аналоги гликопротеинов gp120 и gp41. В результате отобрали клоны В-клеток, с использованием мРНК из которых получили рекомбинантные антитела. На следующем этапе из большого набора антител отобрали пять с лучшими характеристиками нейтрализации панели псевдовирусов. Два из пяти антител, названные PG9 и PG16, обладали способностью нейтрализовать широкий спектр первичных изолятов ВИЧ-1.

РЕГИОНЫ УЯЗВИМОСТИ Env И bNAbs ПРОТИВ НИХ

Регион CD4bs

Наибольшее внимание с момента выделения bNAbs второго поколения привлекало антитело VRC01. Это стало следствием того, что VRC01, обладая превосходными характеристиками нейтрализации, взаимодействует с тримером gp120 в одном из наиболее консервативных участков этого комплекса, а именно, в месте связывания молекулы gp120 с рецептором CD4 на поверхности лимфоцитов (CD4bs). Именно CD4bs как центральный регион уязвимости представляется наиболее очевидной и привлекательной мишенью для антител, способных нейтрализовать антигенно гетерогенную популяцию вируса (рис. 2А). Существование подобных антител предполагалось ранее [24, 42]. Однако, кроме «искусственного» антитела b12, долгое время не удавалось обнаружить другие антитела к этому региону. Новая методика выделения антител позволила получить три bNAbs (VRC01, VRC02 и VRC03), связывающихся с CD4bs. Все они оказались соматическими вариантами, близкими по своим характеристикам, при этом VRC03 проявлял намного меньшую широту нейтрализации [38]. Уже первые эксперименты показали, что антитело VRC01 имеет ряд особенностей, в первую очередь, высокий уровень соматических мутаций в гипервариабельных областях. Обычно количество соматических мутаций в антителах составляет 5–20%, у VRC01 этот показатель достигает 40%. Еще одна особенность этого антитела – сходство структуры вариабельного домена антитела и структуры рецептора CD4 Т-хелперных клеток. Взаимодействие вариабельного домена VRC01 частично имитирует взаимодействие рецептора CD4 с CD4bs на поверхности gp120 [13]. При этом взаимодействие антитела стерически более точно, что и позволяет ему достигать впечатляющих результатов в реакции нейтрализации. Несмотря на достаточно близкую имитацию рецептора CD4, взаимодействие VRC01 с gp120 имеет ряд отличий. При взаимодействии молекулы CD4 с поверхностью тримера Env в субъединице gp120 происходят структурные перестройки, в то время как при сходном контакте антитела VRC01 с триме-

ром таких изменений не возникает. Напротив, антитело закрепляет промежуточную конформацию тримера, препятствующую проникновению вируса в клетку [43].

Вслед за выделением VRC01 последовали работы, в которых с использованием аналогичного подхода выделили еще ряд CD4bs-связывающих антител, таких, как PGV04, CH30–34 [44], 3BNC117, 3BNC60, 3BNC55, 12A21, 12A12, 8ANC195, 8ANC131, 8ANC134, NIH45–46, 1NC9, 1B2530 [45].

Несмотря на то что все эти антитела взаимодействуют с регионом CD4bs на поверхности gp120, детали этого взаимодействия могут существенно различаться [45]. Например, некоторые из них при связывании с мономером gp120 способны вызывать конформационные изменения, подобные тем, которые вызывает CD4-рецептор, в то время как другие такой способностью не обладают [46]. Кроме того, антитела, связывающиеся с CD4bs, несмотря на их структурную близость, могут быть продуктами различных генов, что позволяет выделять подклассы среди VRC01-подобных антител [47].

Отдельно необходимо упомянуть антитело NIH45–46^{G54W}. Получение этого антитела стало результатом теоретической работы по улучшению одного из наиболее эффективных антител, связывающихся с CD4bs, – NIH45–46. Анализ модели комплекса NIH45–46 с gp120, полученной на основе рентгенографических данных, дал основание предполагать, что замена глицина в позиции 54 на триптофан повысит площадь контакта между антителом и вирусным гликопротеином. В результате направленного мутагенеза по замещению глицина на триптофан получено антитело NIH45–46^{G54W}, которое действительно обладает повышенной шириной и эффективностью нейтрализации [48].

Регион связывания PG9 и PG16

Антитела PG9 и PG16, представляющие собой соматические варианты, отличаются шириной нейтрализации. Так, PG9 нейтрализует 78% псевдовирусов панели, в то время как PG16 – 73%. Более того, эффективность нейтрализации некоторых псевдовирусов этими антителами различается на 2 порядка. Это может говорить о том, что эпитопы, с которыми взаимодействуют антитела PG9 и PG16, несколько различаются.

Во взаимодействии PG9/PG16 с тримером gp120 важное значение имеют углеводы, связанные с остатками аспарагина в положении 156 и 160. В отличие от полученного ранее антитела 2G12, которое взаимодействует с гликанами аспарагинов N332, N339 и N392 [33], во взаимодействии с PG9 и PG16 вовлечены не только углеводы, но и аминокислот-

ные остатки gp120 в районе второй и третьей вариабельных петель (V2, V3) [39]. Искусственные белки, имитирующие структуру контактирующего с PG9 региона gp120, позволили выяснить детали взаимодействия PG9 с антигеном. Центральная роль в стабилизации комплекса PG9–gp120 принадлежит третьей вариабельной петле тяжелой цепи антитела (CDR H3), которая имеет ряд структурных особенностей. Необычайная длина этой петли – 30 аминокислотных остатков, позволяет ей, проникая мимо связанных с gp120 углеводов, достигать поверхности белка в районе петель V2 и V3 гликопротеина gp120. Вершина петли имеет молотообразное строение, образованное двумя β-складками. Внешняя β-складка CDR H3 антитела образует четыре водородных связи с β-складкой в основании петли V2 (рис. 3). Кроме водородных связей, немаловажную роль в связывании антитела с эпитопом играет взаимодействие отрицательно заряженной CDR H3 с углеводами, связанными с остатками аспарагина в позициях N160 и N156. Площадь контакта между третьей вариабельной петлей и углеводами составляет не менее половины общей площади взаимодействия этого антитела с gp120 [14]. Предполагается, что это взаимодействие частично имитирует природное взаимодействие тримера gp120 с поверхностью клетки [49].

Антитела PG9 и PG16 – первые из идентифицированных bNAbs, которые взаимодействуют со вторым регионом уязвимости Env, включающим аминокислотные остатки петель V1/V2 и олигоманнозные цепочки в позициях 160 и 156 (или 176) (рис. 2B). Позже получили ряд широконейтрализующих антител, таких, как CH01–04 [50] и PGT141–145 [51], которые связываются с этим регионом [14]. Отличительная черта всех этих антител – необычайная длина CDR H3, позволяет им не только эффективно преодолевать углеводный щит gp120, но и взаимодействовать с углеводами, что вносит большой вклад в связывание антитела с вирусным гликопротеином [14].

Регион петли V3

Центральные элементы еще одного региона уязвимости тримера gp120, с которым взаимодействует существенное число широконейтрализующих антител, – гликан аспарагина N332, обогащенный остатками маннозы, и фрагмент третьей вариабельной петли (V3) (рис. 2B) [15]. К группе антител, связывающихся с этим районом, можно отнести антитело первого поколения 2G12, поскольку углеводные остатки на поверхности gp120, образующие эпитоп 2G12, расположены в этом же регионе. Все другие bNAbs, связывающиеся с этим регионом, используют, кроме углеводов, аминокислотные остатки gp120 (таблица). Структурная организация этих антител,

как и PG9-подобных антител, определяется возможной доступностью белкового остова. Антитела PGT127-128 имеют удлиненную петлю CDR H2, а антитело PGT135 – удлиненную CDR H1 [52].

Антитело PGT135 использует две удлиненные петли (CDR H1 и CDR H3) для проникновения сквозь углеводный щит gp120, при этом более существенный вклад вносит CDR H3. Помимо контакта с белковой частью gp120, обе цепи антитела взаимодействуют и с прилегающими гликанами. CDR H3 взаимодействует с гликанами аспарагинов N332, N386 и N392, а CDR H1 – только с гликаном N386. Как и у антитела PG9, площадь контакта PGT135 с углеводной частью эпитопа составляет не менее половины от общей площади контакта и вносит решающий вклад в суммарную энергию связывания антитела с эпитопом [15]. Меньшую роль углеводы играют во взаимодействии антитела с gp120 другого bNAbs, PGT128. Это антитело также взаимодействует с гликаном N332, однако основная роль принадлежит гликану N301, который взаимодействует как с CDR H3, так и с CDR H2. CDR H2 за счет удлиненной структуры вносит заметный вклад во взаимодействие антитела с gp120. Однако более важна небольшая β -складка на вершине CDR H3 и β -складчатый участок петли V3 gp120. Именно этот контакт за счет образования водородных связей наиболее значим для взаимодействия PGT128 с Env [53].

Стоит отметить еще два антитела, связывающихся с этим регионом, – PGT121 и 10-1074, которые, в отличие от 2G12, PGT135 и PGT128, взаимодействуют с гликанами сложного типа, менее представленными на поверхности Env, чем с гликанами олигоманнозного типа [54].

Если расположить антитела 2G12, PGT135 и PGT128 по степени участия углеводов в их взаимодействии с антигеном, то первым в ряду будет 2G12, взаимодействующее только с углеводами. Вторым – PGT135, у которого взаимодействие с углеводами вносит больший вклад, чем взаимодействие с аминокислотным остовом. Последнее в ряду – PGT128, взаимодействие которого в большей степени определяется контактом CDR H3 с аминокислотными остатками петли V3. Интересно, что в этом ряду по мере роста участия белковой части растет ширина нейтрализации (см. *таблицу*). Из этого можно сделать вывод, что ширина нейтрализации зависит от доли, которую во взаимодействии антитела с антигеном занимает белковый контакт. Антитело 2G12, взаимодействующее только с углеводами, хотя и способно нейтрализовать ряд изолятов, тем не менее, обладает умеренной шириной нейтрализации, и напротив, при большой доле участия белка во взаимодействии наблюдается максимальная ширина

нейтрализации. Можно предположить, что использование иммуногенов, индуцирующих наработку антител, которые связываются только с углеводами на поверхности тримера Env, не будет приводить к образованию достаточно эффективных bNAbs.

Регион MPER

Четвертый регион уязвимости – MPER gp41. Этот регион, как и регион CD4bs, долгое время рассматривали как одну из предпочтительных мишеней для широконейтрализующих антител. Как и регион CD4bs, MPER gp41 обладает высокой степенью консервативности. Это связано с тем, что регион MPER – это ключевой элемент в процессе слияния вирусной мембраны и мембраны клетки, и выполнение этой функции требует сохранения постоянства аминокислотного состава. Действительно, bNAbs, связывающиеся с этим регионом, найдены одними из первых. Однако изучение ВИЧ-инфицированных, чьи сыворотки обладали способностью нейтрализовать широкий спектр первичных изолятов ВИЧ-1, показало, что связывающиеся с этим регионом bNAbs встречаются редко. Более того, моноклональные антитела 2F5, 4E10, Z13 к этому региону обладают полиреактивностью. В то же время в 2012 году обнаружили антитело 10E8 (*таблица*), связывающееся с этим регионом и способное нейтрализовать чрезвычайно большой спектр первичных изолятов ВИЧ-1 (до 99%), не обладая при этом полиреактивностью.

Регион на границе gp120 и gp41

Совсем недавно были открыты bNAbs, связывающиеся одновременно с gp120 и gp41 [17, 55]. Как и у большинства bNAbs (кроме связывающихся с регионом MPER gp41), во взаимодействии с этими антителами со стороны Env принимают участие углеводы, однако, в отличие от других антител, углеводы, критичные для связывания антител серии PGT151-158 [56] и 8ANC195 [17], располагаются на gp41. Большинство структурных особенностей у этих антител общие с уже известными bNAbs. Так, антитело 8ANC195 имеет удлиненную петлю CDR H3 и выступающий каркасный участок FWR3. Такая структура позволяет антителу успешно проникать мимо гликанов N234 и N276, контактируя с петлями D и V5 gp120 [17]. Антитело PGT151 обладает удлиненными петлями CDR H3 и CDR L1 и способно взаимодействовать с Env в конформации, которую этот комплекс образует перед слиянием вирусной и клеточной мембран. Интересную особенность антител серии PGT151-158 представляет их способность опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность [56].

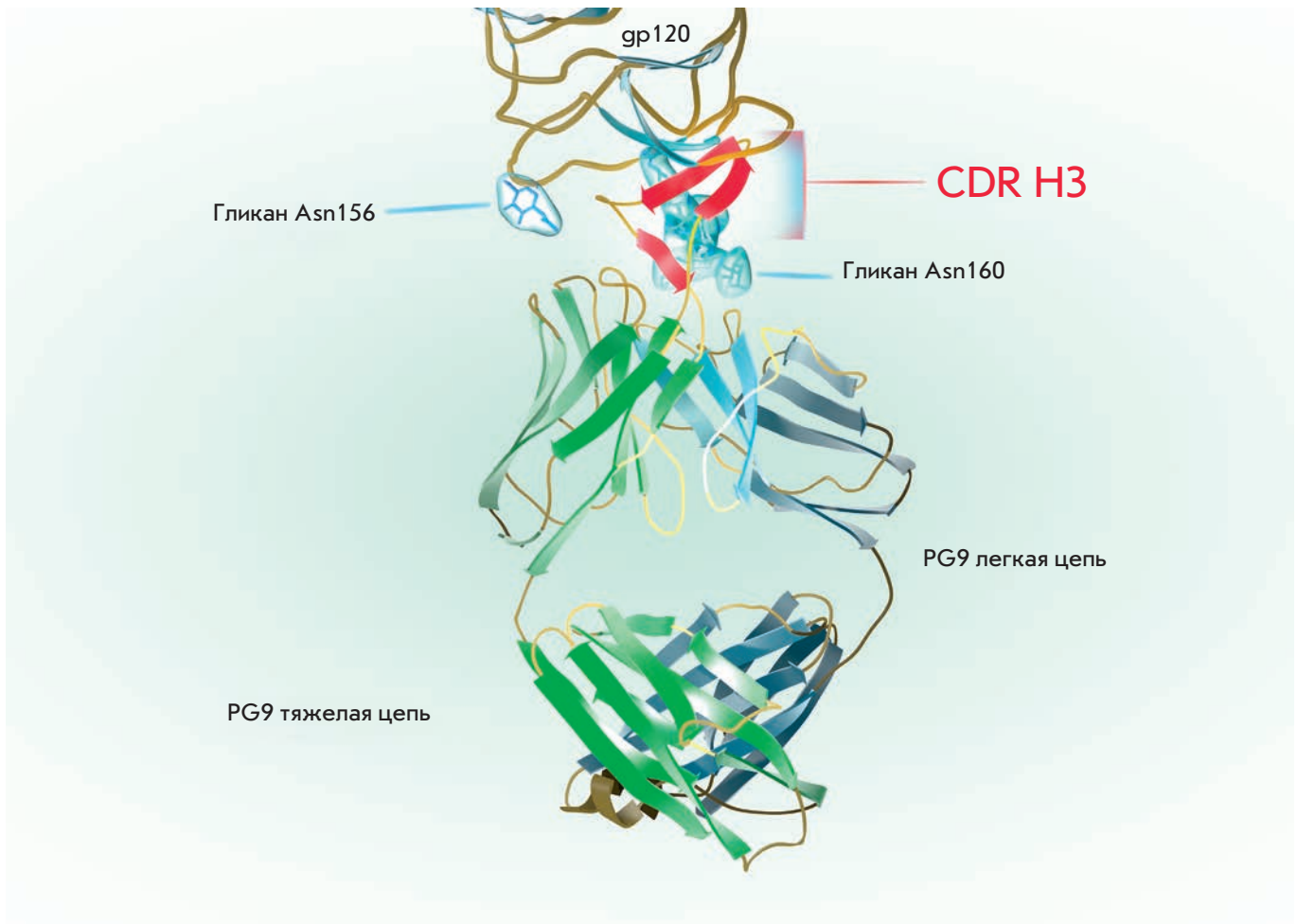


Рис. 3. Комплекс Fab-фрагмента антитела PG9 и вирусного поверхностного белка gp120 ВИЧ-1. Варибельный и константный домены тяжелой цепи окрашены в зеленый цвет, варибельный и константный домены легкой цепи – в серый. Отдельно выделена третья варибельная петля тяжелой цепи антитела CDR H3, имеющая необычную длину и проникающая к аминокислотным остаткам gp120 мимо гликанов. β -Складки петли CDR H3, играющие важную роль во взаимодействии, показаны красным цветом. Гликаны, связанные с остатками аспарагина N160 и N156, мимо которых проникает петля CDR H3 PG9, показаны в виде синих облаков. Изображение сделано на основе структур 3U4E и 3DNN из Protein Data Bank

ВЫВОДЫ

Открытие и изучение широконейтрализующих антител против ВИЧ-1 стало важной вехой в развитии знаний о механизмах гуморального иммунного ответа. Несмотря на то что появление этих антител в организме не позволяет избежать развития СПИДа и полностью элиминировать вирус, на их примере мы видим удивительный спектр адаптивных возможностей В-клеточного иммунитета, позволяющих противодействовать даже таким изощренным вирусам, как ВИЧ-1.

Изучение широконейтрализующих антител показывает, что иммунная система, несмотря на постоянный «уход» ВИЧ-1 от иммунного ответа, обладает

способностью за счет механизмов соматического мутагенеза вести отбор антител, которые могут, в конечном итоге, связываться с небольшим числом «замаскированных» константных участков белков вируса и нейтрализовать его.

Необычно высокая нейтрализующая способность bNAbs связана, в основном, с их структурными особенностями. Прежде всего, обращает на себя внимание строение гиперварибельных петель, участвующих в связывании антигена. За счет аминокислотных вставок петли CDR, особенно CDR H3, удлиняются, что позволяет им преодолевать углеводный щит Env, достигая константного белкового «дна». Более того, форма самих петель изменяется, обеспечивая макси-

мально возможную площадь контакта петли с антигеном.

Важная особенность, очень часто наблюдаемая у широконейтрализующих антител против ВИЧ-1, – вовлечение углеводных остатков gp120–gp41 в связывание с антигеном. В комплексе с небольшими константными участками белка углеводы оказываются прекрасной мишенью для таких антител. Более того, зачастую углеводы вносят равный и даже больший вклад в суммарную энергию связывания антитела с антигеном.

Еще один интересный механизм, которым могут пользоваться bNAbs – это мимикрия. Один из регионов уязвимости Env ВИЧ-1 – регион взаимодействия gp120 с рецептором CD4 Т-клеток. Паратоп антител,

связывающихся с этим регионом, имитирует структуру рецептора CD4 и тем самым обеспечивает высокую надежность и специфичность взаимодействия.

Все эти открытия, с одной стороны, раскрывают огромный потенциал, которым обладает иммунная система для противодействия патогенам, а с другой, позволяют утверждать, что вакцина, способная вызвать наработку широконейтрализующих антител, сможет защитить от этой инфекции. ●

Авторы выражают благодарность за критические замечания А.И. Шаповалу, за подготовку иллюстраций Е.А. Колосовой. Работа выполнена при поддержке РНФ (соглашение № 14-14-00660).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. // Acta Naturae. 2009. V. 1. № 1. P. 32–50.
2. Деев С.М., Лебеденко Е.Н., Петровская Л.Е., Долгих Д.А., Габибов А.Г., Кирпичников М.П. // Успехи химии. 2015. V. 84. № 1. P. 1–26.
3. Peeters M., D'Arc M., Delaporte E. // AIDS Rev. 2014. V. 16. № 1. P. 23–34.
4. Burton D.R., Barbas C.F., Persson M.A., Koenig S., Chanock R.M., Lerner R.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 22. P. 10134–10137.
5. Zhu P., Chertova E., Bess J., Lifson J.D., Arthur L.O., Liu J., Taylor K.A., Roux K.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 26. P. 15812–15817.
6. Pancera M., Zhou T., Druz A., Georgiev I.S., Soto C., Gorman J., Huang J., Acharya P., Chuang G.-Y., Ofek G., et al. // Nature. 2014. V. 514. № 7523. P. 455–461.
7. Nowak S.A., Chou T. // Biophys. J. 2009. V. 96. № 7. P. 2624–2636.
8. Johnson W.E., Desrosiers R.C. // Annu. Rev. Med. 2002. V. 53. № 1. P. 499–518.
9. Gray E.S., Moore P.L., Choge I.A., Decker J.M., Bibollet-Ruche F., Li H., Leseke N., Treurnicht F., Mlisana K., Shaw G.M., et al. // J. Virol. 2007. V. 81. № 12. P. 6187–6196.
10. Frost S.D.W., Wrinn T., Smith D.M., Kosakovsky Pond S.L., Liu Y., Paxinos E., Chappey C., Galovich J., Beauchaine J., Petropoulos C.J., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 51. P. 18514–18519.
11. Moore P.L., Gray E.S., Wibmer C.K., Bhiman J.N., Nonyanane M., Sheward D.J., Hermanus T., Bajimaya S., Tumba N.L., Abrahams M.-R., et al. // Nat. Med. 2012. V. 18. № 11. P. 1688–1692.
12. Malenbaum S.E., Yang D., Cavacini L., Posner M., Robinson J., Cheng-Mayer C. // J. Virol. 2000. V. 74. № 23. P. 11008–11016.
13. Zhou T., Georgiev I., Wu X., Yang Z.-Y., Dai K., Finzi A., Kwon Y. Do, Scheid J.F., Shi W., Xu L., et al. // Science. 2010. V. 329. № 5993. P. 811–817.
14. McLellan J.S., Pancera M., Carrico C., Gorman J., Julien J.-P., Khayat R., Louder R., Pejchal R., Sastry M., Dai K., et al. // Nature. 2011. V. 480. № 7377. P. 336–343.
15. Kong L., Lee J.H., Doores K.J., Murin C.D., Julien J.-P., McBride R., Liu Y., Marozsan A., Cupo A., Klasse P.-J., et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2013. V. 20. № 7. P. 796–803.
16. Guenaga J., Wyatt R.T. // PLoS Pathog. 2012. V. 8. № 7. P. e1002806.
17. Scharf L., Scheid J.F., Lee J.H., West A.P., Chen C., Gao H., Gnanapragasam P.N.P., Mares R., Seaman M.S., Ward A.B., et al. // Cell Rep. 2014. V. 7. № 3. P. 785–795.
18. Muster T., Steindl F., Purtscher M., Trkola A., Klima A., Himmler G., Rucker F., Kattinger H. // J. Virol. 1993. V. 67. № 11. P. 6642–6647.
19. Buchacher A., Predl R., Strutzenberger K., Steinfellner W., Trkola A., Purtscher M., Gruber G., Tauer C., Steindl F., Jungbauer A. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1994. V. 10. № 4. P. 359–369.
20. Montefiori D.C., Pantaleo G., Fink L.M., Zhou J.T., Zhou J.Y., Bilska M., Miralles G.D., Fauci A.S. // J. Infect. Dis. 1996. V. 173. № 1. P. 60–67.
21. Dhillion A.K., Donners H., Pantophlet R., Johnson W.E., Decker J.M., Shaw G.M., Lee F.-H., Richman D.D., Doms R.W., Vanham G., et al. // J. Virol. 2007. V. 81. № 12. P. 6548–6562.
22. Gray E.S., Taylor N., Wycuff D., Moore P.L., Tomaras G.D., Wibmer C.K., Puren A., DeCamp A., Gilbert P.B., Wood B., et al. // J. Virol. 2009. V. 83. № 17. P. 8925–8937.
23. Simek M.D., Rida W., Priddy F.H., Pung P., Carrow E., Laufer D.S., Lehrman J.K., Boaz M., Tarragona-Fiol T., Miirio G., et al. // J. Virol. 2009. V. 83. № 14. P. 7337–7348.
24. Li Y., Svehla K., Louder M.K., Wycuff D., Phogat S., Tang M., Migueles S.A., Wu X., Phogat A., Shaw G.M., et al. // J. Virol. 2009. V. 83. № 2. P. 1045–1059.
25. Walker L.M., Simek M.D., Priddy F., Gach J.S., Wagner D., Zwick M.B., Phogat S.K., Poignard P., Burton D.R. // PLoS Pathog. 2010. V. 6. № 8. P. e1001028.
26. Thèze J., Chakrabarti L.A., Vingert B., Porichis F., Kaufmann D.E. // Clin. Immunol. 2011. V. 141. № 1. P. 15–30.
27. Cao Y., Qin L., Zhang L., Safrin J., Ho D.D. // N. Engl. J. Med. 1995. V. 332. № 4. P. 201–208.
28. Sather D.N., Armann J., Ching L.K., Mavrantoni A., Sellhorn G., Caldwell Z., Yu X., Wood B., Self S., Kalams S., et al. // J. Virol. 2009. V. 83. № 2. P. 757–769.
29. Doria-Rose N.A., Klein R.M., Manion M.M., O'Dell S., Phogat A., Chakrabarti B., Hallahan C.W., Migueles S.A., Wrammert J., Ahmed R., et al. // J. Virol. 2009. V. 83. № 1. P. 188–199.
30. Hraber P., Seaman M.S., Bailer R.T., Mascola J.R., Montefiori D.C., Korber B.T. // AIDS. 2014. V. 28. № 2. P. 163–169.
31. Euler Z., van den Kerkhof T.L.G.M., van Gils M.J., Burger

- J.A., Edo-Matas D., Phung P., Wrin T., Schuitemaker H. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 4. P. 2045–2055.
32. Burton D.R., Pyati J., Koduri R., Sharp S.J., Thornton G.B., Parren P.W., Sawyer L.S., Hendry R.M., Dunlop N., Nara P.L. // *Science.* 1994. V. 266. № 5187. P. 1024–1027.
33. Scanlan C.N., Pantophlet R., Wormald M.R., Ollmann Saphire E., Stanfield R., Wilson I.A., Katinger H., Dwek R.A., Rudd P.M., Burton D.R. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 14. P. 7306–7321.
34. Mouquet H., Scheid J.F., Zoller M.J., Krogsgaard M., Ott R.G., Shukair S., Artyomov M.N., Pietzsch J., Connors M., Pereyra F., et al. // *Nature.* 2010. V. 467. № 7315. P. 591–595.
35. Zwick M.B., Jensen R., Church S., Wang M., Stiegler G., Kunert R., Katinger H., Burton D.R. // *J. Virol.* 2005. V. 79. № 2. P. 1252–1261.
36. Nelson J.D., Brunel F.M., Jensen R., Crooks E.T., Cardoso R.M.F., Wang M., Hessel A., Wilson I.A., Binley J.M., Dawson P.E., et al. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 8. P. 4033–4043.
37. Ferrantelli F., Rasmussen R.A., Hofmann-Lehmann R., Xu W., McClure H.M., Ruprecht R.M. // *Vaccine.* 2002. V. 20 Suppl 4. P. A61–65.
38. Wu X., Yang Z.-Y., Li Y., Hogerkorp C.-M., Schief W.R., Seaman M.S., Zhou T., Schmidt S.D., Wu L., Xu L., et al. // *Science.* 2010. V. 329. № 5993. P. 856–861.
39. Walker L.M., Phogat S.K., Chan-Hui P.-Y., Wagner D., Phung P., Goss J.L., Wrin T., Simek M.D., Fling S., Mitcham J.L., et al. // *Science.* 2009. V. 326. № 5950. P. 285–289.
40. Georgiev I.S., Doria-Rose N.A., Zhou T., Kwon Y. Do, Staup R.P., Moquin S., Chuang G.-Y., Louder M.K., Schmidt S.D., Altae-Tran H.R., et al. // *Science.* 2013. V. 340. № 6133. P. 751–756.
41. Tong J., Bendahhou S., Chen H., Agnew W.S. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. № 15. P. 3253–3254.
42. Binley J.M., Lybarger E.A., Crooks E.T., Seaman M.S., Gray E., Davis K.L., Decker J.M., Wycuff D., Harris L., Hawkins N., et al. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 23. P. 11651–11668.
43. Li Y., O'Dell S., Walker L.M., Wu X., Guenaga J., Feng Y., Schmidt S.D., McKee K., Louder M.K., Ledgerwood J.E., et al. // *J. Virol.* 2011. V. 85. № 17. P. 8954–8967.
44. Wu X., Zhou T., Zhu J., Zhang B., Georgiev I., Wang C., Chen X., Longo N.S., Louder M., McKee K., et al. // *Science.* 2011. V. 333. № 6049. P. 1593–1602.
45. Scheid J.F., Mouquet H., Ueberheide B., Diskin R., Klein F., Oliveira T.Y.K., Pietzsch J., Fenyo D., Abadir A., Velinzon K., et al. // *Science.* 2011. V. 333. № 6049. P. 1633–1637.
46. Falkowska E., Ramos A., Feng Y., Zhou T., Moquin S., Walker L.M., Wu X., Seaman M.S., Wrin T., Kwong P.D., et al. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 8. P. 4394–4403.
47. Kwong P.D., Mascola J.R. // *Immunity.* 2012. V. 37. № 3. P. 412–425.
48. Diskin R., Scheid J.F., Marcovecchio P.M., West A.P., Klein F., Gao H., Gnanapragasam P.N.P., Abadir A., Seaman M.S., Nussenzweig M.C., et al. // *Science.* 2011. V. 334. № 6060. P. 1289–1293.
49. Moulard M., Lortat-Jacob H., Mondor I., Roca G., Wyatt R., Sodroski J., Zhao L., Olson W., Kwong P.D., Sattentau Q.J. // *J. Virol.* 2000. V. 74. № 4. P. 1948–1960.
50. Bonsignori M., Hwang K.-K., Chen X., Tsao C.-Y., Morris L., Gray E., Marshall D.J., Crump J.A., Kapiga S.H., Sam N.E., et al. // *J. Virol.* 2011. V. 85. № 19. P. 9998–10009.
51. Walker L.M., Huber M., Doores K.J., Falkowska E., Pejchal R., Julien J.-P., Wang S.-K., Ramos A., Chan-Hui P.-Y., Moyle M., et al. // *Nature.* 2011. V. 477. № 7365. P. 466–470.
52. Corti D., Lanzavecchia A. // *Annu. Rev. Immunol.* 2013. V. 31. P. 705–742.
53. Pejchal R., Doores K.J., Walker L.M., Khayat R., Huang P.-S., Wang S.-K., Stanfield R.L., Julien J.-P., Ramos A., Crispin M., et al. // *Science.* 2011. V. 334. № 6059. P. 1097–1103.
54. Mouquet H., Scharf L., Euler Z., Liu Y., Eden C., Scheid J.F., Halper-Stromberg A., Gnanapragasam P.N.P., Spencer D.I.R., Seaman M.S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 47. P. E3268–3277.
55. Blattner C., Lee J.H., Sliepen K., Derking R., Falkowska E., de la Peña A.T., Cupo A., Julien J.-P., van Gils M., Lee P.S., et al. // *Immunity.* 2014. V. 40. № 5. P. 669–680.
56. Falkowska E., Le K.M., Ramos A., Doores K.J., Lee J.H., Blattner C., Ramirez A., Derking R., van Gils M.J., Liang C.-H., et al. // *Immunity.* 2014. V. 40. № 5. P. 657–668.
57. Huang J., Ofek G., Laub L., Louder M.K., Doria-Rose N.A., Longo N.S., Imamichi H., Bailer R.T., Chakrabarti B., Sharma S.K., et al. // *Nature.* 2012. V. 491. № 7424. P. 406–412.
58. Chuang G.-Y., Acharya P., Schmidt S.D., Yang Y., Louder M.K., Zhou T., Kwon Y. Do, Pancera M., Bailer R.T., Doria-Rose N.A., et al. // *J. Virol.* 2013. V. 87. № 18. P. 10047–10058.
59. Binley J.M., Wrin T., Korber B., Zwick M.B., Wang M., Chappey C., Stiegler G., Kunert R., Zolla-Pazner S., Katinger H., et al. // *J. Virol.* 2004. V. 78. № 23. P. 13232–13252.
60. Cardoso R.M.F., Brunel F.M., Ferguson S., Zwick M., Burton D.R., Dawson P.E., Wilson I.A. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 365. № 5. P. 1533–1544.
61. Corti D., Langedijk J.P.M., Hinz A., Seaman M.S., Vanzetta F., Fernandez-Rodriguez B.M., Silacci C., Pinna D., Jarrossay D., Balla-Jhagjhoorsingh S., et al. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 1. P. e8805.
62. Zwick M.B., Labrijn A.F., Wang M., Spenlehauer C., Saphire E.O., Binley J.M., Moore J.P., Stiegler G., Katinger H., Burton D.R., et al. // *J. Virol.* 2001. V. 75. № 22. P. 10892–10905.
63. Pejchal R., Gach J.S., Brunel F.M., Cardoso R.M., Stanfield R.L., Dawson P.E., Burton D.R., Zwick M.B., Wilson I.A. // *J. Virol.* 2009. V. 83. № 17. P. 8451–8462.
64. Pietzsch J., Scheid J.F., Mouquet H., Klein F., Seaman M.S., Jankovic M., Corti D., Lanzavecchia A., Nussenzweig M.C. // *J. Exp. Med.* 2010. V. 207. № 9. P. 1995–2002.
65. Liao H.-X., Lynch R., Zhou T., Gao F., Alam S.M., Boyd S.D., Fire A.Z., Roskin K.M., Schramm C.A., Zhang Z., et al. // *Nature.* 2013. V. 496. № 7446. P. 469–476.
66. Bonsignori M., Montefiori D.C., Wu X., Chen X., Hwang K.-K., Tsao C.-Y., Kozink D.M., Parks R.J., Tomaras G.D., Crump J.A., et al. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 8. P. 4688–4692.
67. Klein F., Gaebler C., Mouquet H., Sather D.N., Lehmann C., Scheid J.F., Kraft Z., Liu Y., Pietzsch J., Hurley A., et al. // *J. Exp. Med.* 2012. V. 209. № 8. P. 1469–1479.