

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Емельянова Людмила Александровна

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Конструирование химерных антител против микоантигенов и
исследование их свойств

Направление подготовки

06.06.01 Биологические науки

Направленность

03.01.03 Молекулярная биология

Аспирант _____ Л. А. Емельянова

Научный руководитель _____ д.б.н. Н. В. Тикунова

Новосибирск – 2019

Общая характеристика работы

Актуальность исследования.

В мире существуют различные грибковые инфекции, которые варьируют от неопасных местных до опасных для жизни хронических инвазивных микозов, смертность от которых может достигать 80% [1]. С одной стороны, существует проблема точной и своевременной диагностики инвазивных и хронических микозов. С другой стороны препараты, используемые для лечения этих заболеваний, часто недостаточно эффективны из-за возникновения резистентных штаммов микопатогенов, а также имеют серьезные побочные эффекты для организма человека. В связи с этим, актуальной задачей является поиск альтернативных способов лечения грибковых инфекций.

Одним из подходов к диагностике и терапии грибковых заболеваний является создание препаратов на основе моноклональных антител. Такие свойства антител, как высокая специфичность и аффинность, позволяют рассматривать их и в качестве молекул для диагностики инфекционных заболеваний. Иммуноглобулины также являются природными терапевтическими молекулами, которые обладают рядом эффекторных функций. Они способны активировать классические механизмы иммунной системы организма, например, опсонизацию и последующий фагоцитоз, активацию системы комплемента, нейтрализацию токсинов и вирусов, а также запускать антителозависимую клеточную цитотоксичность [2]. Развитие в области генной инженерии и методиках получения рекомбинантных белков в эукариотических клетках дало возможность получать рекомбинантные антитела с целевыми свойствами.

Микопатогены, как и другие микроорганизмы, имеют большое количество антигенных молекул, которые входят в состав их клеточной стенки [3]. Строение клеточной стенки у разных видов микопатогенов достаточно сильно отличается, что позволяет использовать их уникальные антигены для детекции и уничтожения патогенных клеток. На сегодняшний день активно ведутся разработки по созданию препаратов на основе моноклональных антител для диагностики и лечения инвазивных микозов. Были созданы различные иммуноферментные тест-системы, некоторые из которых уже применяются в медицине, хотя имеют ряд недостатков. Однако ни один из разработанных терапевтических препаратов моноклональных антител против грибковых патогенов пока не был одобрен для использования в клинике [4].

Цель данной работы – получение полноразмерных антител против синтетических олигосахаридов клеточной стенки микопатогенов и исследование их свойств.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Получить две панели моноклональных антител против синтетического аналога галактоманнана клеточной стенки аспергилл и β -1,3-глюкана клеточной стенки микопатогенов и определить их аффинность.
2. Оценить специфичность моноклональных антител mAb 7B8 и mAb 8G4 против синтетического аналога галактоманнана клеточной стенки аспергилл.
3. Получить мышинное рекомбинантное антитело mAb 7B8-IgG1 против галактоманнана клеточной стенки аспергилл, в котором исходные мышинные константные домены подкласса IgG3 были заменены на IgG1, и определить его аффинность.
4. Оценить специфичность моноклональных антител mAb 3G11 и mAb 5H5 против синтетического аналога β -1,3-глюкана клеточной стенки микопатогенов.
5. Оценить протективную активность моноклональных антител mAb 3G11 и mAb 5H5 против синтетического аналога β -1,3-глюкана клеточной стенки микопатогенов.
6. Получить линии штаммов-продуцентов химерных антител ch 3G11 и ch 5H5 против β -1,3-глюкана клеточной стенки микопатогенов и определить их аффинность.

Научная новизна работы.

В рамках данной работы получены высокоаффинные моноклональные антитела mAb 7B8 и mAb 8G4 против синтетического аналога галактоманнана клеточной стенки аспергилл. Показано эффективное связывание моноклональных антител mAb 7B8 и mAb 8G4 с клеточной стенкой *Aspergillus fumigatus* и *Aspergillus flavus* и отсутствие связывания с другими микопатогенами, а также грамположительными и грамотрицательными бактериями. Было получено мышинное рекомбинантное антитело mAb 7B8-IgG1, и показано незначительное снижение аффинности данного антитела по сравнению с аффинностью исходного моноклонального антитела mAb 7B8.

Также были получены высокоаффинные моноклональные антитела mAb 3G11 и mAb 5H5 против синтетического аналога β -1,3-глюкана клеточной стенки микопатогенов. Показано эффективное связывание моноклональных антител mAb 3G11 и mAb 5H5 с клеточной стенкой различных видов низших грибов и отсутствие связывания с другими видами грамположительных и грамотрицательных бактерий. Также в мышинной модели системного кандидоза была доказана протективная активность данных моноклональных антител. Были получены линии штаммов-продуцентов CD DG-44/ch 3G11 и CD DG-44/ch 5H5, и наработаны химерные антитела ch 3G11 и ch 5H5 против β -1,3-глюкана клеточной стенки микопатогенов. Было показано, что антитело ch3G11 почти не уступает исходному мышинному моноклональному антителу в аффинности.

Методология и методы исследования.

В работе были использованы стандартные методы генной инженерии, включая работу с прокариотическими клетками, ДНК, белками, а также современные подходы к наработке полноразмерных антител в эукариотических клетках и созданию штаммов-

продуцентов. Для исследований использовались методы ИФА, конфокальной микроскопии и поверхностного плазмонного резонанса.

Апробация работы и публикации.

Результаты данной работы представлены на Международной конференции 12th International Congress of Cell Biology (Прага, Чехия, 2016), на научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе» (Новосибирск, Россия, 2016), на V Съезде биохимиков России (Сочи, Россия, 2016), на XXI Международной экологической студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий» (Новосибирск, Россия, 2016), на Всероссийской конференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, Россия, 2017) и на Всероссийском Конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии «XXI Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, Россия, 2018).

По результатам данной работы было опубликовано 9 работ, из них 2 статьи в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК, индексируемых в Wos и Scopus, Q1.

Личное участие автора.

Автором самостоятельно выполнены все эксперименты, связанные с методом ИФА, наработкой и очисткой антител, определением нуклеотидной последовательности моноклональных антител, электрофоретическим разделением белков и конструирование экспрессионных векторов.

Иммунизация мышей, получение гибридом и линий штаммов-продуцентов, а также эксперименты, связанные с протективной активностью антител и методом конфокальной микроскопией выполнены совместно с Матвеевым А.Л. Определение констант аффинности на биосенсорном анализе ProteOn XPR36 производилось совместно с к.х.н. Байковым И.К. Анализ результатов всех экспериментов проводился совместно с д.б.н. Тикуновой Н.В. и Матвеевым А.Л.

Благодарности.

Автор выражает признательность сотрудникам из лаборатории химии гликоконъюгатов, Института органической химии имени Н. Д. Зелинского РАН за любезно предоставленные синтетические аналоги олигосахаридов клеточной стенки низших грибов: чл.-корр. РАН Нифантьеву Н. Э., к.х.н. Крылову В.Б., к.х.н. Аргунов Д.А., Соловьеву А.С., проф. Шашков А.С. и к.х.н. Гербст А.Г..

Автор благодарит сотрудников из лаборатории молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН за плодотворное обсуждение результатов и перспектив исследований: д.б.н. Тикунову Н.В., Матвеева А.Л., Хлусевич Я., к.б.н. Байкова И.К., Бардашеву А.В. и Тикунова А.Ю.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 16-14-00083.

Результаты и обсуждение

1. Получение моноклональных антител против синтетических аналогов олигосахаридов клеточной стенки низших грибов.

На первом этапе работы для получения мышинных моноклональных антител были использованы синтетические аналоги олигосахаридов клеточной стенки низших грибов, которые были синтезированы нашими коллегами из Лаборатории химии гликоконъюгатов ИОХ РАН. В качестве синтетического аналога галактоманнана был выбран олигосахарид GM-1, содержащий четыре β -1-5-связанных галактофуранозидных звена, присоединенных посредством β -1-6-связи к остатку маннозы (рис. 1А). Выбранный пентасахарид представляет собой специфический фрагмент в структуре галактоманнана клеточной стенки *Aspergillus fumigatus* [5]. Используя синтетический аналог галактоманнана GM-1, также были получены конъюгаты данного пентасахарида с бычьим сывороточным альбумином (GM-1-BSA) и с биотином (GM-1-Biot). Аналогом синтетического β -1,3-глюкана был выбран олигосахарид G9, содержащий девять β -1-3-связанных остатков глюкозы (рис. 1Б). В исследованиях было показано, что данный олигосахарид достаточно длинный, хорошо имитирует естественный β -1,3-глюкан обладает высокой иммуногенностью [6]. Также были получены конъюгаты данного олигосахарида с бычьим сывороточным альбумином (G9-BSA) и с биотином (G9-Biot).

Для получения моноклональных антител против синтетического аналога галактоманнана клеточной стенки *A. fumigatus*, мышей линии BALB/c иммунизировали конъюгатом синтетического аналога галактоманнана с BSA (GM-1-BSA) четыре раза, а для получения моноклональных антител против синтетического аналога β -1,3-глюкана в качестве иммуногена был взят конъюгат G9-BSA. Через 4, 8 и 12 недель после первой иммунизации проводили скрининг сывороток мышей методом ИФА для определения уровня IgG против синтетических аналогов галактоманнана и β -1,3-глюкана. Для данного метода в качестве антигена был использован конъюгат синтетического аналога галактоманнана с биотином (GM-1-Biot) и конъюгат синтетического β -1,3-глюкана с биотином (G9-Biot). После этого клетки селезенки и лимфоузлов иммунизированных мышей были гибридизованы с миеломной линией клеток Sp 2|0. Для отбора целевых гибридом клетки после гибридизации культивировали на селективной среде. Полученные гибридомы высевали в 96-луночные планшеты и через 10-14 дней проводили скрининг для отбора гибридом продуцирующих специфические антитела против синтетического аналога галактоманнана и β -1,3-глюкана. Связывание отдельных клонов с конъюгатами GM-1-Biot и с G9-Biot анализировали методом ИФА, в результате чего было отобрано

стенки низших грибов определялась аналогичным образом, только в качестве антигена использовался конъюгат синтетического аналога β -1,3-глюкана с биотином (G9-Biot). Константы аффинности для моноклональных антител mAb 3G11 и mAb 5H5 были $K_D = (1,1 \pm 0,1) \times 10^{-8}$ М и $K_D = (1,9 \pm 0,2) \times 10^{-9}$ М соответственно (рис. 2Б). Аффинность других отобранных моноклональных антител была ниже ($K_D > 10^{-6}$ М).

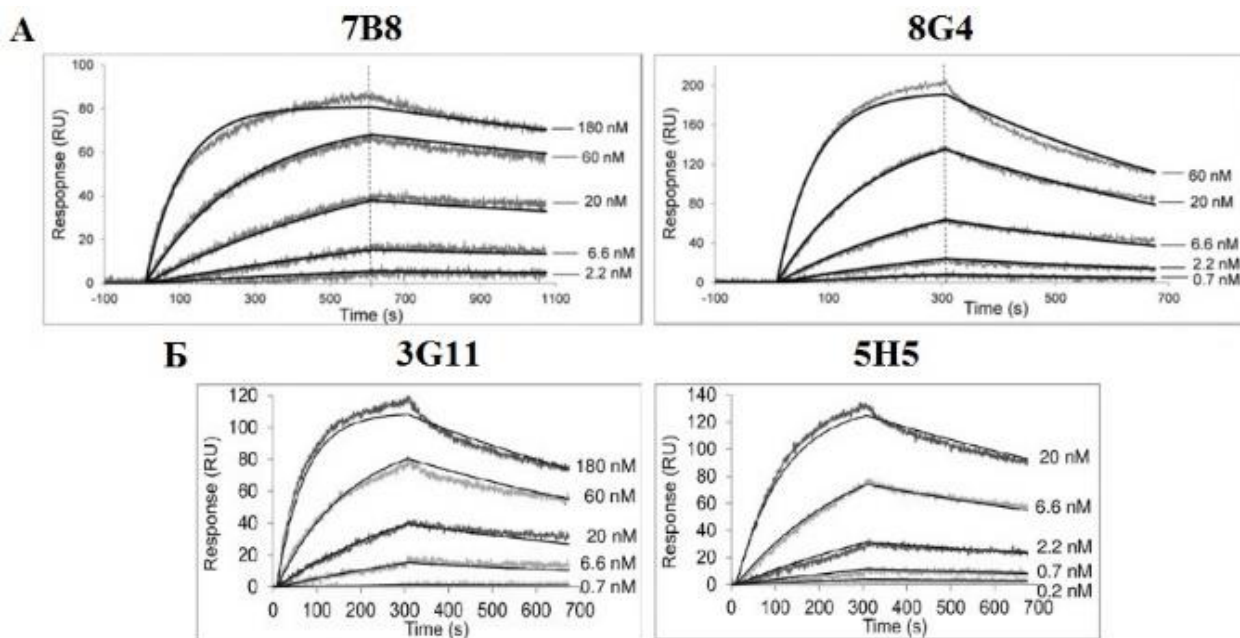


Рис. 2. (А) Связывание mAb 7B8 и mAb 8G4 с конъюгатом GM-1-Biot. Константы скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a) для антитела mAb 7B8 составили $3,0 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ и $5,6 \times 10^4 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$, а для антитела mAb 8G4 $1,5 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ и $2,3 \times 10^5 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$. Константы равновесия, рассчитанные как $K_D = k_d/k_a$, составили $5,3 \times 10^{-9}$ М и $6,4 \times 10^{-9}$ М соответственно. (Б) Связывание mAb 3G11 и mAb 5H5 с конъюгатом G9-Biot. Константы скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a) для антитела mAb 3G11 составили $8,8 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ и $8,2 \times 10^4 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$, а для антитела mAb 5H5 $8,1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ и $4,2 \times 10^5 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$. Константы равновесия $K_D = k_d/k_a$ составили $1,1 \times 10^{-8}$ М и $1,9 \times 10^{-9}$ М соответственно.

Чистоту и размер моноклональных антител подтверждали с помощью 12% ПААГ-электрофореза. На рисунке 3 приведены данные для высокоаффинных моноклональных антител. Молекулярная масса тяжелых и легких цепей антител mAb 7B8 и mAb 8G4 по расчетным данным равна 49,5 кДа и 24,2 кДа соответственно. Молекулярная масса тяжелой и легкой цепей антитела mAb 3G11 по расчетным данным равна 49,3 кДа и 23,5 кДа соответственно, а mAb 5H5 - 48,9 кДа и 23,9 кДа соответственно.

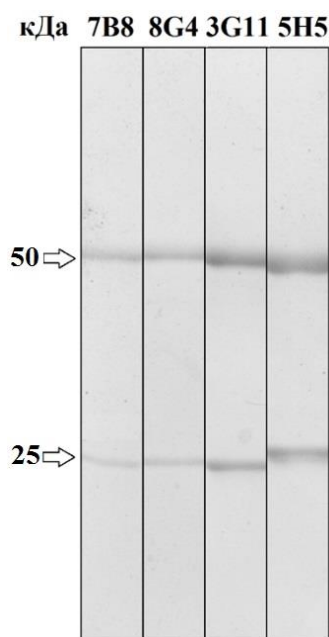


Рис. 3 12% SDS-ПААГ очищенных моноклональных антител mAb 7B8, mAb 8G4, mAb 3G11 и mAb 5H5 в восстанавливающих условиях. Белковый маркер молекулярной массы указан с левой стороны рисунка в кДа.

Нами был определен подкласс IgG, а также нуклеотидные последовательности, кодирующие константные и переменные домены тяжелой и легких цепей полученных моноклональных антител. Для этого фрагменты генов, кодирующие переменный и участок константного домена тяжелой цепи антитела, амплифицировали с использованием вырожденных праймеров [7]:

Mouse IgHV_MH1_EcoRI_dir: 5' CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC 3'

Mouse IgG2a_HindIII_rev: 5' GGAAAGCTTCTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA 3'

Mouse IgG2b_HindIII_rev: 5' GGAAAGCTTAGGGGCCAGTGGATAGACTGATGG 3'

Mouse IgG1_HindIII_rev: 5' GGAAAGCTTATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC 3'

Mouse IgG3_HindIII_rev: 5' GGAAAGCTTAGGGACCAAGGGATAGACAGATGG 3'

Для генов, кодирующих переменный и участок константного домена легкой цепи антитела, использовали следующие вырожденные праймеры [7]:

Mouse IgKV_EcoRI_dir: 5' CCGAATTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA 3'

Mouse IgK_HindIII_rev: 5' GGGAAGCTTGATACAGTTGGTGCAGCATCAGC 3'

В праймеры также были добавлены сайты для эндонуклеаз рестрикции EcoRI и HindIII, которые были использованы для дальнейшего клонирования нуклеотидных последовательностей тяжелых и легких цепей антител в плазмиду pUC18. В результате секвенирования было определено, что среди девяти отобранных моноклональных антител против галактоманнана, наиболее перспективные антитела mAb 7B8 и mAb 8G4 имели схожие аминокислотные последовательности и относились к подклассу IgG3, тогда как другие принадлежали к подклассу IgG1. Легкие цепи всех моноклональных антител

против синтетического аналога галактоманнана относились к семейству каппа. Среди десяти моноклональных антител против β -1,3-глюкана, только антитело mAb 5H5 принадлежало к подклассу IgG3, а остальные относились к подклассу IgG1. Легкие цепи всех моноклональных антител против синтетического аналога β -1,3-глюкана относились к каппа типу.

2. Специфическое взаимодействие моноклональных антител mAb 7B8 и mAb 8G4 против галактоманнана с клеточными культурами низших грибов и бактерий.

Чтобы продемонстрировать способность моноклональных антител mAb 7B8 и mAb 8G4 против синтетического аналога галактоманнана (GM-1) специфически распознавать природный галактоманнан, для экспериментов по иммуофлюоресценции были взяты различные клеточные культуры низших грибов и бактерий. Оценку специфичности антител mAb 7B8 и mAb 8G4 проводили с помощью конфокальной микроскопии с использованием различных видов низших грибов таких, как *A. fumigatus*, *Aspergillus flavus*, и *Candida albicans* (рис. 4), а также грамположительных и грамотрицательных бактериальных клеток, включая *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* и *Staphylococcus aureus* (данные не приводятся). Данные виды низших грибов и бактерий были взяты из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур (КЭМТК) ИХБФМ СО РАН. Полученные результаты показали, что антитела mAb 7B8 и mAb 8G4 связывались с клеточной стенкой различных видов аспергилл [8] и не выявляли клеточную стенку других видов низших грибов и бактерий.

Известно, что некоторые виды грибов и бактерий экспрессируют в культуральную среду олигосахариды, аналогичные структуре галактоманнана из клеточной стенки *A. fumigatus*. Поэтому на следующем этапе мы проверили специфичность связывания моноклональных антител mAb 7B8 и mAb 8G4 с микоантигенами из культуральной жидкости различных видов грибов и бактерий методом ИФА. Для данной лабораторной ИФА тест-системы на основе антител mAb 7B8 и mAb 8G4 в ЛММБ были сварены их конъюгаты с пероксидазой хрена. Супернатанты *A. fumigatus* и *A. flavus* были добавлены к mAb 7B8 и к mAb 8G4 (рис. 5), после чего были выявлены конъюгатом mAb 7B8 и mAb 8G4 с пероксидазой хрена соответственно. Супернатанты *C. albicans*, *E. coli*, *B. longum* и *L. plantarum* и других протестированных бактерий не были распознаны в ИФА тест-системе (данные для *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* и *S. aureus* не приведены). Важно отметить, что оба моноклональных антитела mAb 7B8 и 8G4 не выявляли клетки *B. longum* ни с помощью конфокальной микроскопия, ни с помощью

ИФА тест-системы. Однако известно, что ИФА тест-система фирмы BioRad на основе антитела mAb EB-A2 имеет кросс-реактивность с различными бифидобактериями, включая вид *B. longum* [9], и это часто приводит к ложноположительным результатам, ведь бифидобактерии присутствуют в микрофлоре желудочно-кишечного тракта человека. Отсутствие связывания моноклональных антител mAb 7B8 и mAb 8G4 с клеточной стенкой бифидобактерий указывает на высокую специфичность данных антител, что дает надежду на создание более высокоспецифичной ИФА тест-системы на основе антител mAb 7B8 и mAb 8G4, которую можно будет использовать для выявления антигенов при аспергилезах.

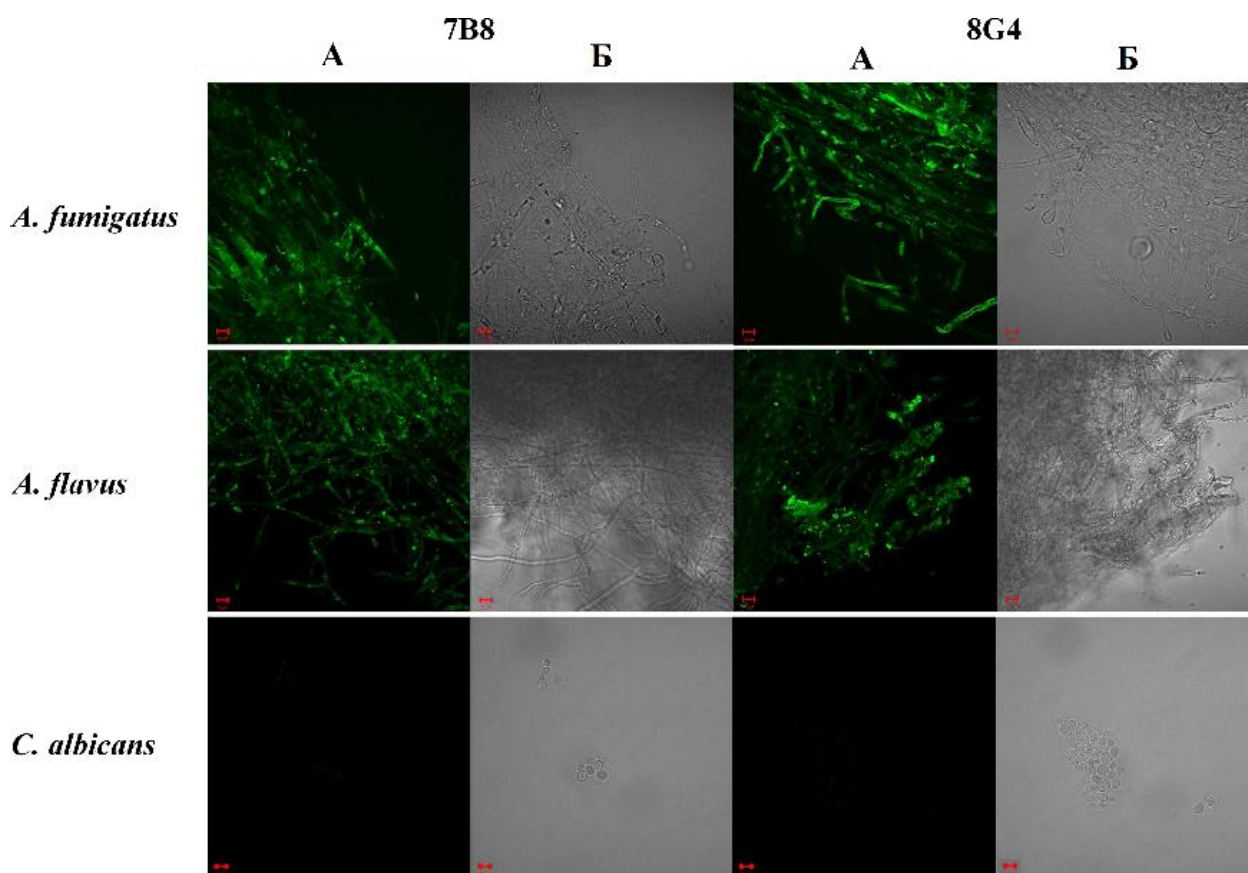


Рис. 4 (А) Для визуализации связывания моноклональных антител mAb 7B8 и mAb 8G4 с клеточной стенкой низших грибов методом конфокальной микроскопии использовали препарат антитела против мышиного IgG конъюгированного с Alexa Fluor 488. (Б) Интерференционно-контрастная микроскопия различных видов грибов.

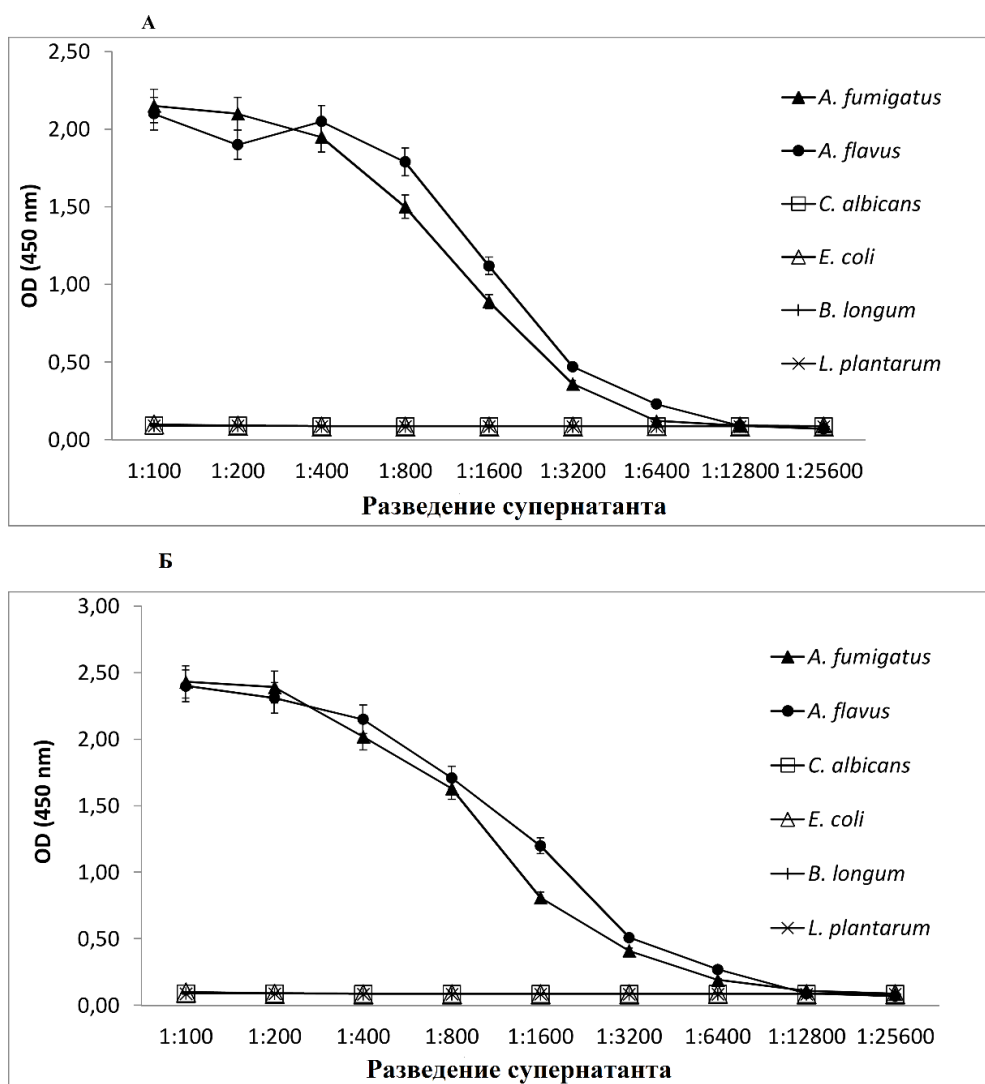


Рис. 5 Связывание моноклональных антител mAb 7B8 (А) и mAb 8G4 (Б) с супернатантами различных видов грибов и бактерий. Для ИФА использовали соответствующие конъюгаты mAb 7B8 и mAb 8G4 с пероксидазой хрена.

3. Конструирование плазмид для получения рекомбинантного мышинового антитела против галактоманнана в эукариотических клетках CHO-S.

Моноклональное антитело mAb 7B8 против галактоманнана обладало высокой аффинностью и специфичностью, что делает его перспективным для использования в диагностике. Однако антитела, полученные из асцитной жидкости, достаточно вариабельны и обладают кросс-реактивностью, что затрудняет стандартизацию тест-систем [10]. Было принято решение о получении рекомбинантных мышинных антител в эукариотических клетках, что позволило бы уйти от недостатков моноклональных антител, а также улучшить их свойства. Например, было показано, что использование антител подкласса IgG1 вместо IgG3 повышает чувствительность метода ИФА [11]. Поэтому перспективной идеей для оптимизации генетической структуры антител является

замена генов, кодирующих тяжелую цепь моноклонального антитела mAb 7B8, с подкласса с IgG3 на IgG1.

Ранее в нашей лаборатории были сконструированы плазмиды pCHm2 и pCLm4, кодирующие константные домены IgG1 и IgK человека, которые содержали уникальные сайты рестрикции для легкой замены переменных и константных доменов рекомбинантных антител. Данные плазмиды используются для транзientной экспрессии генов иммуноглобулинов в клетках CHO-S и получения полноразмерных антител. В данных плаزمиде гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи антител, находятся под контролем промотора pCMV. Также для селекции трансфицированных эукариотических клеток плазмиды pCHm2 и pCLm4 содержали гены устойчивости к различным антибиотикам, в плазмиде pCHm2 присутствовал ген устойчивости к генетицину, а в плазмиде pCLm4 был ген устойчивости к гигромицину В.

Необходимо было сконструировать плазмиды pCHm2-7B8-IgG1-mouse и pCLm4-7B8-mouse, в которых гены, кодирующие Vh и Vl домены мышиных моноклональных антител, были объединены в одной рамке трансляции с генами, кодирующими константные домены IgG1 и IgK мыши соответственно. Для амплификации генов, кодирующих переменные домены моноклональных антител и константные домены мышиных антител, использовали праймеры, содержащие сайты рестрикции специфических эндонуклеаз. Для Vh доменов использовали праймеры Vh_dir_XhoI и Vh_rev_Acc65I, а для Vl доменов брали Vl_dir_EcoRV и Vl_rev_HindIII. Для константного домена IgG1 мыши использовали праймеры IgG1_mouse_dir_Acc65I и IgG1_mouse_rev_XbaI, а для мышиного константного домена IgK брали IgK_mouse_dir_HindIII и IgK_mouse_rev_BamHI.

Vh_dir_XhoI: 5' GAGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG 3'

Vh_rev_Acc65I: 5' GACGGTGACCAGGGTACCCTGGCC 3'

Vl_dir_EcoRV: 5' GGGATATCGTGATGACCCAGTCCCC 3'

Vl_rev_HindIII: 5' CCGTTTGATCTCAAGCTTGGTCCC 3'

IgG1_mouse_dir_Acc65I: 5' CAAGGTACCTCAGTCACCGTC 3'

IgG1_mouse_rev_XbaI: 5' CCCTCTAGATCATTTACCAGGAGAGTGGGAG 3'

IgK_mouse_dir_HindIII: 5' GCACCAAGCTTGAAATCAAACGGGCT 3'

IgK_mouse_rev_BamHI: 5' GCCTTGGATCCCTAACACTCATTCCTGTTGAAGCT 3'

Матрицей для амплификации генов переменных доменов антитела 7B8 являлись различные варианты плазмид pUC18, в которые данные генные фрагменты были встроены ранее, а для амплификации генов константных мышиных доменов использовали РНК,

выделенную из гибридомы, которая продуцировала антитела подкласса IgG1 и IgK. Векторные плазмиды pCHm2 и pCLm4, а также наработанные ПЦР-фрагменты обрабатывали соответствующими эндонуклеазами рестрикции, и после этого продукты гидролиза объединяли в реакции лигирования с использованием ДНК-лигазы фага T4. Наличие встроеной фрагментов генов в плазмидных ДНК подтверждали с помощью ПЦР, и затем проводили определение нуклеотидной последовательности встроённых фрагментов. На рисунке 6 в качестве примера изображена генетическая организация сконструированных плазмид pCHm2-7B8-IgG1-mouse и pCLm4-7B8-mouse.

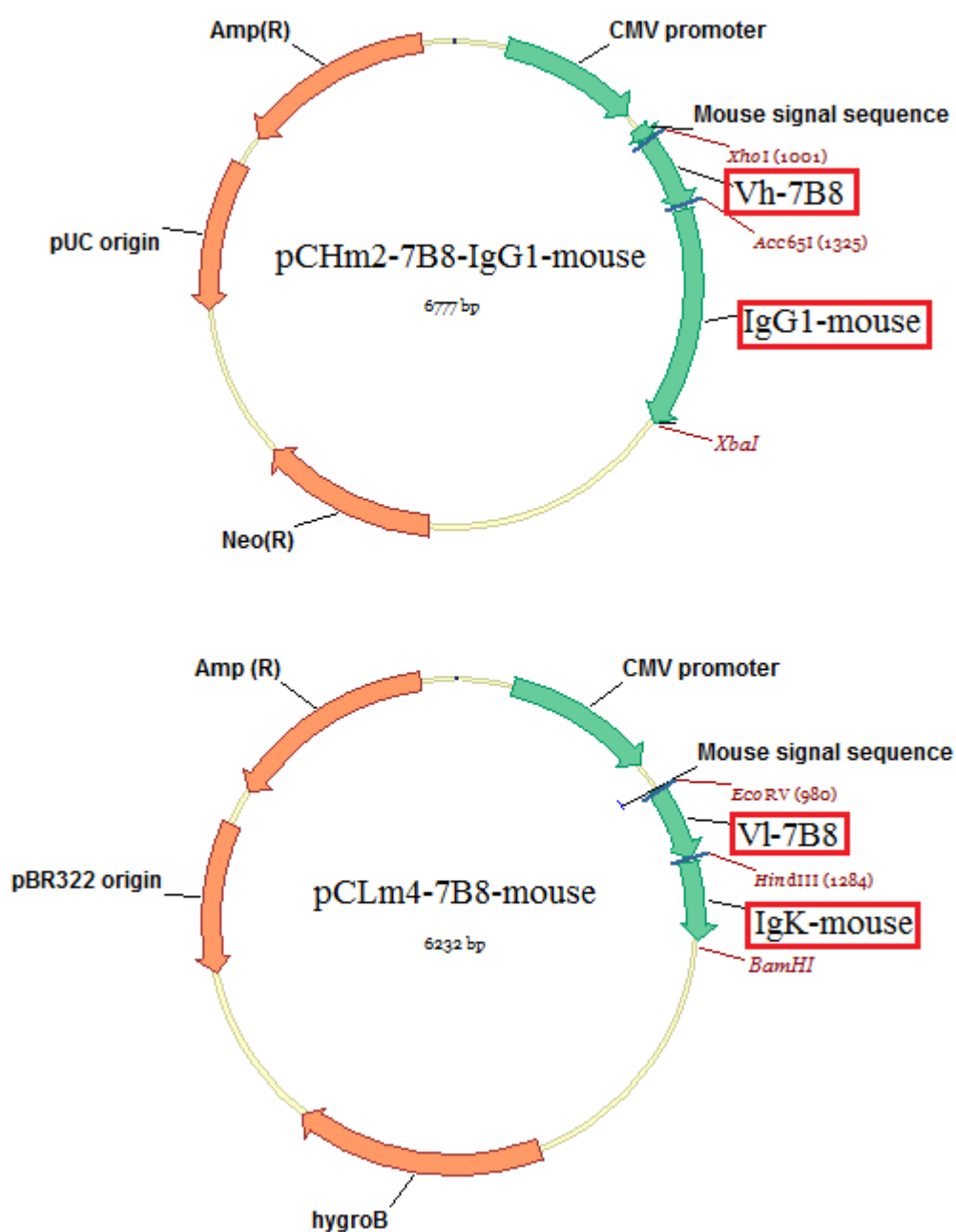


Рис. 6 Генетическая организация сконструированных плазмид pCHm2-7B8-IgG1-mouse и pCLm4-7B8 -mouse.

4. Получение мышинового рекомбинантного антитела против галактоманнана в эукариотических клетках CHO-S.

Для получения мышинового рекомбинантного антитела mAb 7B8-IgG1 против галактоманнана клеточной стенки аспергилл клетки CHO-S трансфицировали соответствующими парами плазмид: pCHm2-7B8-IgG1-mouse + pCLm4-7B8-mouse. Транзиентную экспрессию проводили, используя реагент PEIPro согласно инструкции производителя, в среде OptiMEM I с добавлением GlutaMAX I. Рекомбинантные антитела, содержащиеся в культуральной жидкости, очищали с помощью аффинной хроматографии на колонке с белком А - Sepharose™ 4B. Чистоту и размер очищенного рекомбинантного антитела подтверждали с помощью 12% ПААГ-электрофореза (рис. 7). Молекулярная масса тяжелой и легкой цепей антитела mAb 7B8-IgG1 по расчетным данным равна 49,1 кДа и 24,2 кДа соответственно.

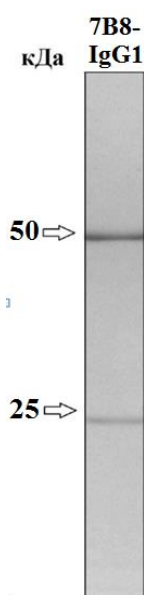


Рис. 7 12% SDS-ПААГ очищенного мышинового рекомбинантного антитела mAb 7B8-IgG1 в восстанавливающих условиях. Белковый маркер молекулярной массы указан с левой стороны рисунка в кДа.

Для мышинового рекомбинантного антитела mAb 7B8-IgG1 также была измерена константа аффинности. Константа связывания при взаимодействии между антителом mAb 7B8-IgG1 и конъюгатом синтетического аналога галактоманнана с биотином (GM-1-Biot) составила $K_D = 18 \times 10^{-9}$ М (рис. 8). Рекомбинантные антитела в результате генно-инженерных манипуляций могут уступать исходным мышинным моноклональным антителам в аффинности, однако значение K_D мышинового рекомбинантного антитела mAb 7B8-IgG1 уменьшилось только в 3 раза по сравнению со значением K_D моноклонального антитела mAb 7B8. Значение константы аффинности, полученное для моноклонального антитела mAb 7B8 в этом эксперименте $K_D = 5,4 \times 10^{-9}$ М.

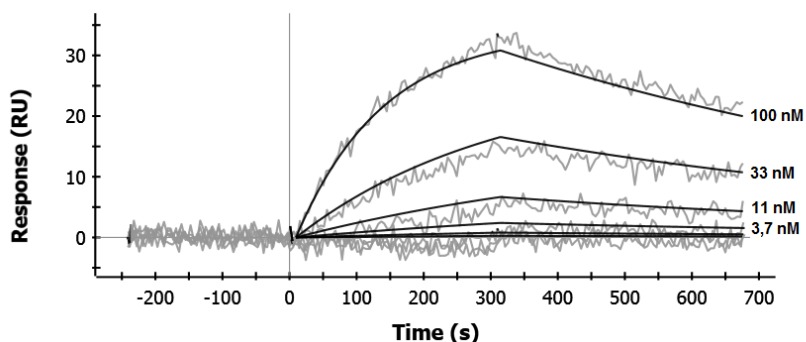


Рис. 8 Связывание mAb 7B8-IgG1 с конъюгатом GM-1-Biot. Константы скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a) для антитела mAb 7B8-IgG1 составили $1,2 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ и $6,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Константы равновесия, рассчитанные как $K_D = k_d/k_a$, составили $18 \times 10^{-9} \text{ M}$.

5. Специфические свойства моноклональных антител mAb 3G11 и mAb 5H5 против β -1,3-глюкана и их протективная активность.

Чтобы продемонстрировать способность моноклональных антител mAb 3G11 и mAb 5H5 против синтетического аналога β -1,3-глюкана клеточной стенки низших грибов (G9) специфически распознавать природный β -1,3-глюкан для экспериментов по иммунофлюоресценции были взяты различные клеточные культуры грибов и бактерий. Оценку специфичности антител mAb 3G11 и mAb 5H5 проводили с помощью конфокальной микроскопии с использованием различных видов низших грибов таких, как *A. fumigatus*, *A. flavus*, *C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium solitum* и *Debaryomyces hansenii*, а также грамположительных и грамотрицательных бактериальных клеток, включая *Bifidobacterium infantis*, *B. longum*, *Enterococcus faecalis*, *L. plantarum*, *S. aureus*, *Alcaligenes faecalis*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* и *S. Enterica*. Данные виды низших грибов и бактерий были взяты из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур (КЭМТК) ИХБФМ СО РАН. На рисунке 9 изображены данные конфокальной микроскопии для некоторых видов низших грибов и бактерий.

Полученные данные показали, что антитела mAb 3G11 и mAb 5H5 связывались с клеточной стенкой низших грибов, однако несмотря на то, что глюканы также являются естественными компонентами бактериальной клеточной стенки, антитела mAb 3G11 и mAb 5H5 не выявляли клеточную стенку протестированных бактерий. Немаловажно, что данные антитела не распознавали бактерии вида *A. faecalis* и *P. aeruginosa*, которые, как известно, продуцируют β -1,3-глюкан, который вызывает ложноположительные результаты

при анализе инвазивных грибковых инфекций с помощью тест-системы Fungitell [12]. Данные результаты можно объяснить тем фактом, что бактериальные β -1,3-глюканы в основном линейны [13], в то время как грибковые β -1,3-глюканы часто имеют 3,6-разветвления [14] и проще связываются с антителами mAb 3G11 и mAb 5H5.

На следующем этапе мы проверили специфичность связывания моноклональных антител mAb 3G11 и 5H5 с низшим грибом *C. albicans* и различными бактериальными клетками методом ИФА. Для этого к антителам mAb 3G11 и mAb 5H5 добавляли клеточные суспензии *C. albicans*, *E. coli* и *P. aeruginosa*, обработанные ультразвуком, после чего комплексы выявляли конъюгатом mAb 5H5 с пероксидазой хрена. Результаты показали, что оба моноклональных антитела выявляли клеточный лизат *C. albicans*, не связывали клеточные лизаты *E. coli* и *P. aeruginosa* (рис. 10). Поскольку было показано, что бактериальные β -1,3-глюканы экспрессируются в культуральную среду [15], мы дополнительно проанализировали супернатанты бактериальных культур методом ИФА (рис. 11). В результате мы убедились, что антитела не выявили супернатанты данных бактериальных культур.

Чтобы проверить протективную активность моноклональных антител mAb 3G11 и mAb 5H5 была смоделирована мышьяная модель системного кандидоза [16]. Четырём группам самок мышей линии BALB/с вводили mAb 3G11, mAb 5H5, моноклональное антитело подкласса IgG1 против другого антигена или 0,9% NaCl. Затем мышей инфицировали смертельной дозой низших грибов *C. albicans*. Как и ожидалось, при введении мышам антитела подкласса IgG1 против другого антигена или 0,9% NaCl никакой защиты от кандидоза не наблюдалось (рис. 12). Процент выживаемости мышей, которым вводили mAb 5H5, был значительно выше, чем процент выживаемости животных, которым вводили мышьяные моноклональные антитела подкласса IgG1 против другого антигена или 0,9% NaCl. Для сравнения показателей выживаемости между обработанными группами мышей использовали точный критерий Фишера. Кроме того, однократная инъекция мышам mAb 3G11 или mAb 5H5 приводила к значительному увеличению времени выживания этих групп мышей (рис. 10). Различия во времени выживания различных групп мышей сравнивались с помощью лог-ранговый теста. Более высокая протективность антитела mAb 5H5 по сравнению с антителом mAb 3G11 может объясняться более высокой аффинностью данного антитела (рис. 3) и его принадлежностью к подклассу IgG3. Антитела из подкласса IgG3 более эффективно запускают механизмы антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), чем антитела из подкласса IgG1 [17].

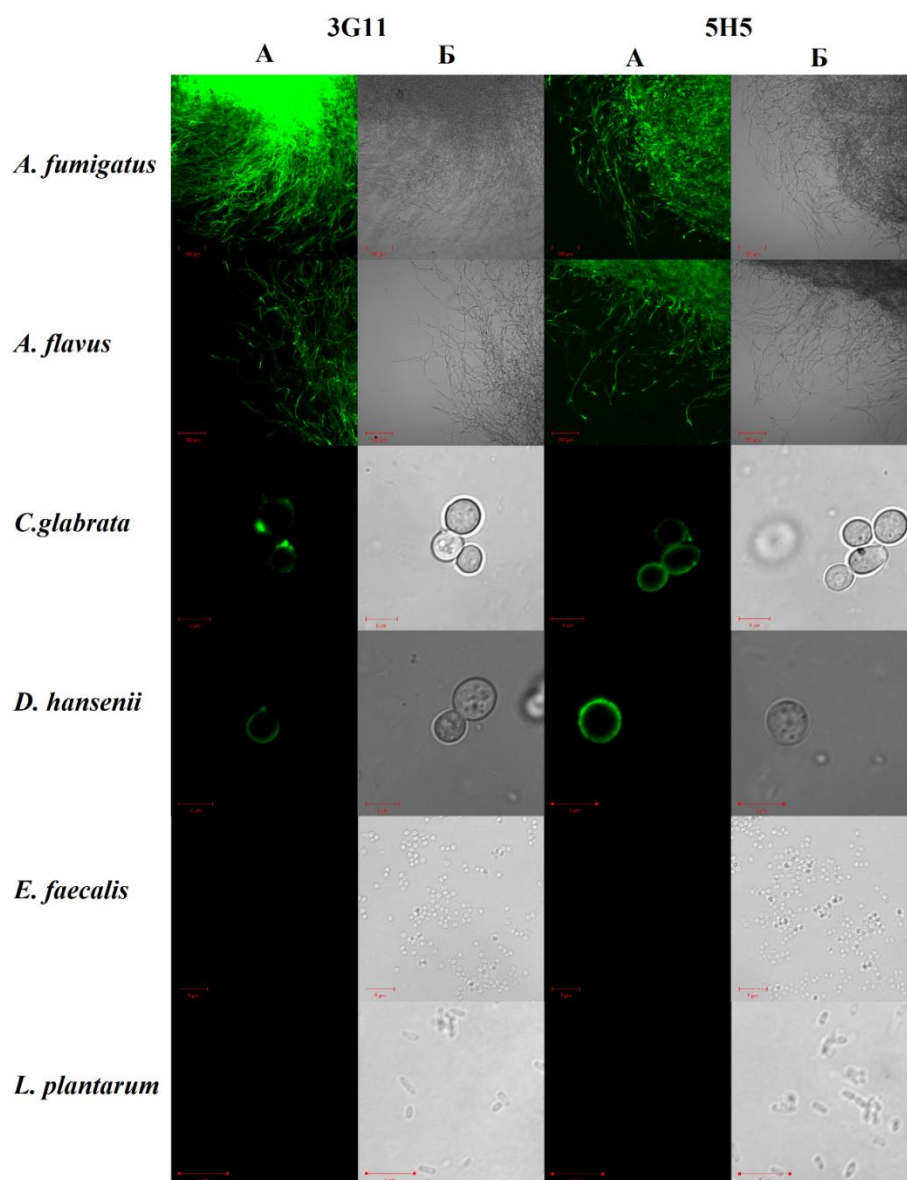


Рис. 9 А) Для визуализации связывания моноклональных антител mAb 3G11 и mAb 5H5 с клеточной стенкой низших грибов и бактерий методом конфокальной микроскопии использовали препарат антитела против мышиного IgG конъюгированного с Alexa Fluor 488. (Б) Интерференционно-контрастная микроскопия различных видов грибов и бактерий. Масштабная линейка для *A. Fumigatus* и *A. flavus* = 100 мкм. Масштабная линейка для других видов грибов и бактерий = 5 мкм.

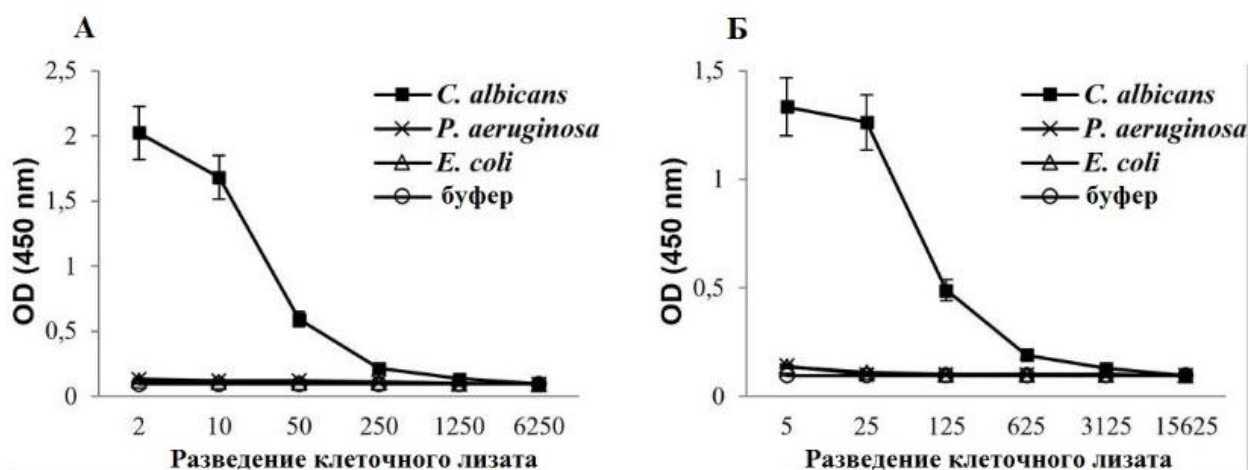


Рис. 10 Связывание моноклональных антител mAb 3G11 (А) и mAb 5H5 (Б) с клеточными лизатами *C. albicans*, *P. aeruginosa* и *E. coli*. Для ИФА использовали конъюгат mAb 5H5 с пероксидазой хрена.

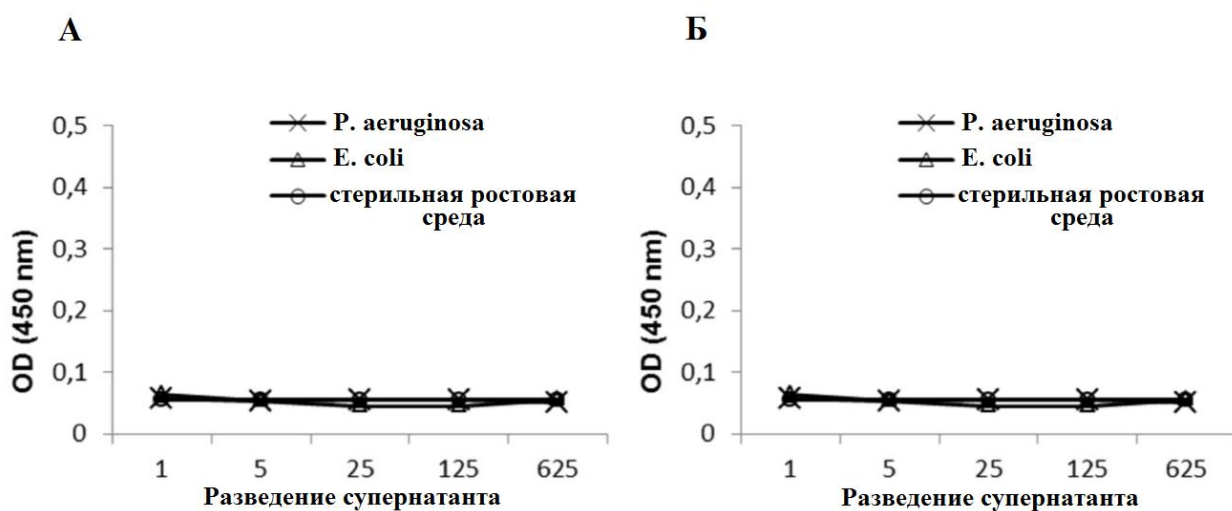


Рис. 11 Связывание моноклональных антител mAb 3G11 (А) и mAb 5H5 (Б) с супернатантами *P. aeruginosa* и *E. coli*. Для ИФА использовали конъюгат mAb 5H5 с пероксидазой хрена.



Рис. 12 Протективная активность mAb 3G11 и mAb 5H5 в мышинной модели системного кандидоза. Мышам линии BALB/с однократно внутривенно вводили указанные моноклональные антитела (150 мкг/мышь в 0,5 мл 0,9% NaCl) или 0,5 мл 0,9% NaCl. Спустя 2 часа мышей инфицировали грибами вида *C. albicans* (5×10^6 КОЕ/мышь). Выживаемость у мышей, которым вводили mAb 5H5, статистически значительно выше, чем у мышей, которым вводили 0,9% NaCl или моноклональное антитело подкласса IgG1 против другого антигена; # $p < 0,05$. Время выживания мышей, которым вводили mAb 3G11 или mAb 5H5, статистически значительно выше, чем у мышей, которым вводили 0,9% NaCl или моноклональное антитело подкласса IgG1 против другого антигена; * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$.

6. Конструирование экспрессионных плазмид для получения штаммов-продуцентов химерных антител против β -1,3-глюкана клеточной стенки низших грибов.

Мышиные моноклональные антитела mAb 3G11 и mAb 5H5 обладали высокой аффинностью и специфичностью, что делает их перспективными для использования в терапии грибковых заболеваний. Было принято решение о получении химерных антител на основе данных моноклональных антител, которые бы обладали меньшей иммуногенностью и необходимыми эффекторными свойствами. Для проведения экспериментов по определению протективной активности химерных антител требуется наработать данные белки в достаточно большом количестве, поэтому актуальной задачей является создание линий штаммов-продуцентов.

Создание линий штаммов-продуцентов химерных антител включает в себя несколько этапов, и первым из них является этап конструирования экспрессионных векторов. На основе плазмид pCHm2 и pCLm4, кодирующих константные домены IgG1 и

IgK человека, были сконструированы вектора pCHm2-3G11, pCLm4-3G11, pCHm2-5H5 и pCLm4-5H5. В них гены, кодирующие Vh и Vl домены мышиных моноклональных антител, были объединены в одной рамке трансляции с генами, кодирующими константные домены IgG1 и IgK человека соответственно. Методика клонирования генов, кодирующих Vh и Vl домены моноклональных антител, была описана ранее.

Также в нашей лаборатории на основе вектора pOptivec-ТОРО ранее была сконструирована плазмида pOptivec-pCAG, которая используется для экспрессии генов иммуноглобулинов в эукариотических клетках. В плазмиде pOptivec-pCAG промотор pCMV был заменен на pCAG, который по литературным данным является более эффективным в эукариотических клетках. Также плазмида содержала сайты эндонуклеаз рестрикции NotI и HpaI для встройки гена, кодирующего тяжелую или легкую цепи антитела. Данная плазмида содержит ген дигидрофолатредуктазы, что позволяет при добавлении ингибиторов данного фермента, например, метатрексата, амплифицировать введенные в геном клеток CHO-DG44 генетические конструкции. Плазмиду pOptivec-pCAG можно успешно использовать для котрансфекции генов тяжелой и легкой цепей антитела.

Таким образом необходимо было сконструировать плазмиды pOptivec-pCAG-H-3G11, pOptivec-pCAG-L-3G11, pOptivec-pCAG-H-5H5 и pOptivec-pCAG-L-5H5. Для этого гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи химерных антител, амплифицировали с использованием специфичных праймеров, содержащих сайты рестрикции эндонуклеаз NotI и HpaI. Для генов, кодирующих тяжелые цепи антител, использовали праймеры pOptivecVl-dir_NotI и pOptivecPolyA-rev_HpaI, а для генов, кодирующих легкие цепи антител, брали pOptivecVh-dir_NotI и pOptivecPolyA-rev_HpaI.

pOptivecVl-dir_NotI: 5' GGGAAGCGGCCGCACCATGAAGTCACAGACCCAGGTCTTCG 3'

pOptivecVh-dir_NotI: 5' GGGAAGCGGCCGCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTG 3'

pOptivecPolyA-rev_HpaI: 5' CCCTTGTTAACCATAGAGCCCACCGCATCCC 3'

Матрицей для ПЦР являлись различные варианты плазмид типа pCHm2 и pCLm4 полученные ранее, содержащие гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи химерных антител. Векторную плазмиду pOptivec-pCAG и наработанные ПЦР-фрагменты обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NotI и HpaI. После этого продукты гидролиза объединяли в реакции лигирования с использованием ДНК-лигазы фага Т4. Наличие встроеной фрагментов генов, кодирующих тяжелые и легкие цепи химерных антител, в плазмидных ДНК подтверждали с помощью ПЦР, и затем проводили определение нуклеотидной последовательности встроеной фрагментов. На рисунке 13 в качестве

примера приведена схема конструирования плазмид pOptivec-pCAG-H-3G11 и pOptivec-pCAG-L-3G11.

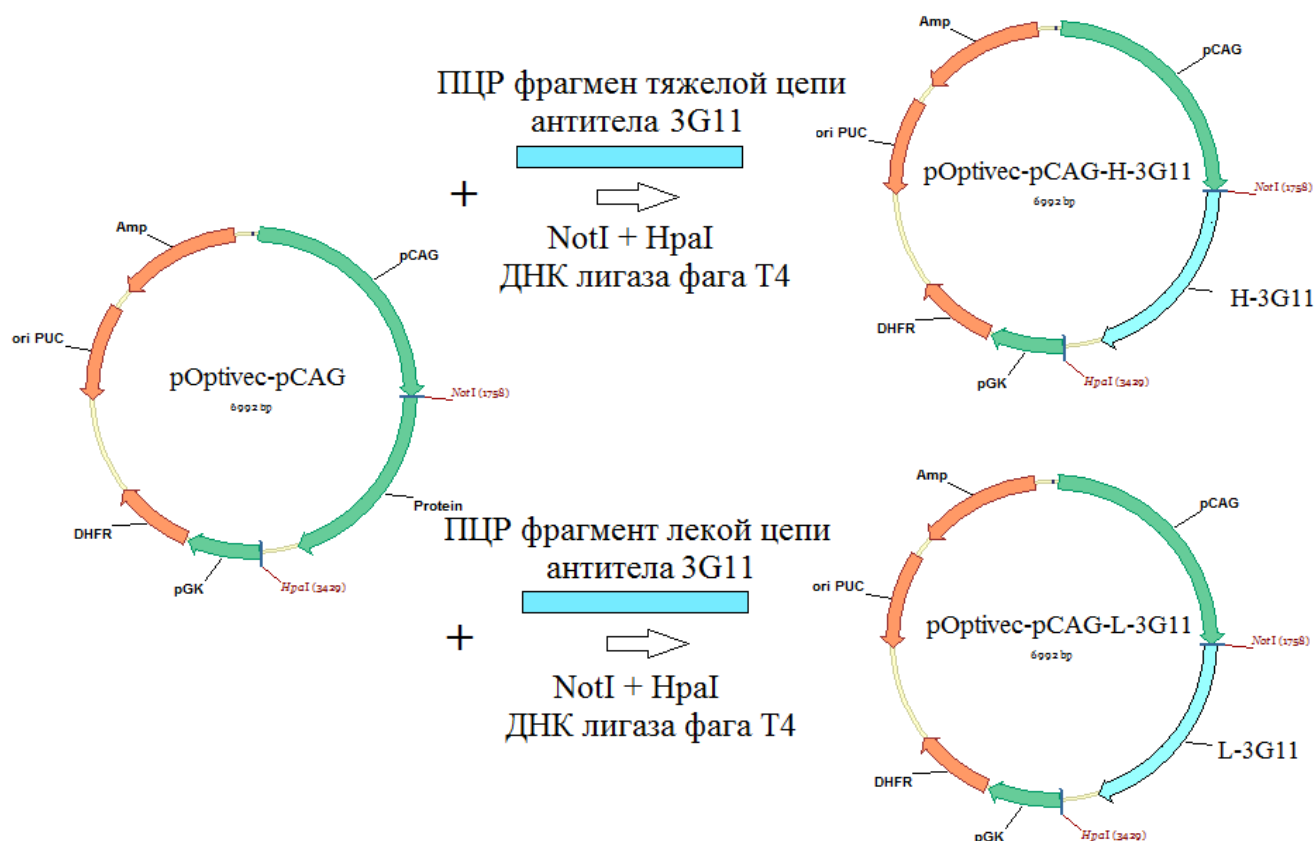


Рис. 13 Конструирование плазмид pOptivec-pCAG-H-3G11 и pOptivec-pCAG-L-3G11, кодирующих тяжелую и легкую цепи химерного антитела ch 3G11 против β -1,3-глюкана клеточной стенки низших грибов.

Для создания линий штаммов-продуцентов использовали клеточную линию CHO-DG44. Данные клетки являются дефектными по гену дигидрофолатредуктазы и способны расти только в специальной среде CD DG-44. Для трансфекции клеток CHO-DG44 использовали реагент PEIPro, добавки GlutaMAX I, Pluronic F-68 и различные комбинации экспрессионных векторов. Например, для получения штамма-продуцента химерного антитела ch 3G11 использовали две комбинации плазмид: pOptivec-pCAG-H-3G11 + pCLm4-3G11 и pCHm2-3G11 + pOptivec-pCAG-L-3G11. Методом ИФА в последствии было показано, что при трансфекции клеток CD DG-44 комбинацией плазмид типа pOptivec-pCAG-H + pCLm4 экспрессия химерных антител была больше. В дальнейшем клетки отбирали на селективной среде CD OptiCHO с добавлением GlutaMAX I и соответствующих антибиотиков, генетицина для плазмид типа pCHm2 и гигромицина В для плазмид типа pCLm4. При добавлении метатрексата в различных концентрациях (100, 200, 300 и 400 нМ) в выживших клетках происходила амплификация целевых генов, после

чего методом ИФА отбирали наиболее продуктивные пулы клеток. Отдельные клоны получали методом предельных разведений. В результате были получены штаммы-продуценты CD DG-44/ch 3G11 и CD DG-44/ch 5H5, продуцирующие химерные антитела против β -1,3-глюкана клеточной стенки низших грибов.

Химерные антитела, содержащиеся в культуральной жидкости, очищали с помощью аффинной хроматографии на колонке с белком А - Sepharose™ 4В. Чистоту и размер очищенных химерных антител ch 3G11 и ch 5H5 подтверждали с помощью 12% ПААГ-электрофореза (рис.14). Молекулярная масса тяжелых и легких цепей антитела ch 3G11 по расчетным данным равна 49,7 кДа и 23,3 кДа соответственно. Молекулярная масса тяжелой и легкой цепей антитела ch 5H5 по расчетным данным равна 48,9 кДа и 23,8 кДа соответственно.

Для химерного антитела ch 3G11 была измерена константа аффинности. Константа связывания при взаимодействии между антителом ch 3G11 и конъюгатом синтетического аналога β -1,3-глюкана с биотином (G9-Biot) составила $K_D = 17 \times 10^{-9}$ М (рис. 15). Значение K_D химерного антитела ch 3G11 уменьшилось меньше чем в 2 раза по сравнению со значением K_D моноклонального антитела mAb 3G11. Значение константы аффинности, полученное для моноклонального антитела mAb 3G11 в этом эксперименте соответствовало предыдущим данным. В дальнейшем планируется провести эксперименты по определению протективной активности химерных антител с использованием мышиной модели системного кандидоза.

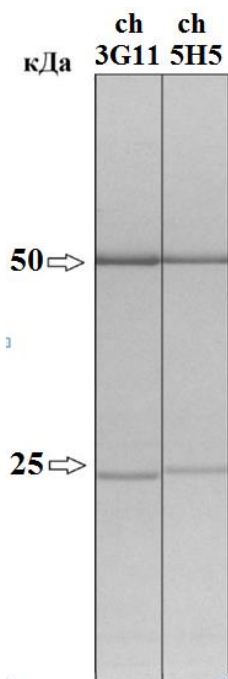


Рис. 14 12% SDS-ПААГ очищенных химерных антител ch 3G11 и ch 5H5 в восстанавливающих условиях. Белковый маркер молекулярной массы указан с левой стороны рисунка в кДа.

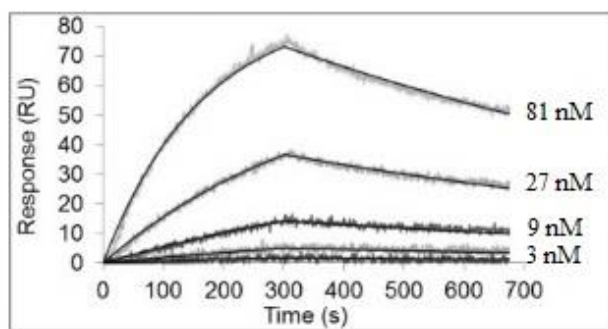


Рис. 15 Связывание ch 3G11 с конъюгатом G9-Biot. Константы скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a) для антитела ch 3G11 составили $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ и $6,4 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Константы равновесия, рассчитанные как $K_D = k_d/k_a$, составили $17 \times 10^{-9} \text{ М}$

Выводы

1. Получены две панели из моноклональных антител против синтетического аналога галактоманнана клеточной стенки аспергилл и против синтетического аналога β -1,3-глюкана клеточной стенки микопатогенов. Константы аффинности для моноклональных антител mAb 7B8 и mAb 8G4 против синтетического аналога галактоманнана составили $KD = 5,3 \times 10^{-9}$ М и $6,4 \times 10^{-9}$ М соответственно, а для антител mAb 3G11 и mAb 5H5 против синтетического β -1,3-глюкана $KD = 1,1 \times 10^{-8}$ М и $1,9 \times 10^{-9}$ М соответственно. Аффинность других моноклональных антител была ниже ($KD > 10^{-6}$ М.)
2. Показано эффективное связывание моноклональных антител mAb 7B8 и mAb 8G4 с клеточной стенкой *Aspergillus fumigatus* и *Aspergillus flavus* и отсутствие связывания с микопатогеном *Candida albicans* и с грамположительными и грамотрицательными бактериями, включая *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* и *Staphylococcus aureus*.
3. Получено мышинное рекомбинантное антитело mAb 7B8-IgG1 против галактоманнана, в котором исходные мышинные константные домены моноклональных антител подкласса IgG3 были заменены на IgG1. Константа аффинности рекомбинантного антитела mAb 7B8-IgG1 составила $KD = 18 \times 10^{-9}$ М.
4. Показано эффективное связывание антител mAb 3G11 и mAb 5H5 с клеточной стенки микопатогенов, включая *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium solitum* и *Saccharomyces cerevisiae*, и отсутствие связывания с грамположительными и грамотрицательными бактериями, такими как *Alcaligenes faecalis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* и *Staphylococcus aureus*.
5. С использованием мышинной модели системного кандидоза показана протективная активность моноклональных антител mAb 3G11 и mAb 5H5.
6. Получены линии штаммов-продуцентов CD DG-44/ch 3G11 и CD DG-44/ch 5H5, продуцирующие химерные антитела ch 3G11 и ch 5H5 против β -1,3-глюкана клеточной стенки микопатогенов. Константа аффинности химерного антитела ch 3G11 составила $KD = 17 \times 10^{-9}$ М.

Список основных публикаций по теме работы

Статьи:

1. Matveev A.L., Krylov V.B., Emelyanova L.A., Solovev A.S., Klusevich Y.A., Baykov I.K., Fontaine T, Latgé J.P., Tikunova N.V., Nifantiev N.E. Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognize *Aspergillus fumigatus* galactomannan // PLoS One. – 2018. – V. 13. – N. 3. – P. e0193938.
2. Matveev A.L., Krylov V.B., Khlusevich Y.A., Baykov I.K., Yashunsky D.V., Emelyanova L.A., Tsvetkov Y.E., Karelin A.A., Bardashova A.V., Wong S.S.W., Aimanian V., Latgé J.P., Tikunova N.V., Nifantiev N.E. Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognizing β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan antigen // PLoS One. – 2019. – V. 14. – N. 4. – P. e0215535.

Тезисы:

1. Klusevich Y.A., Matveev A.L., Kukharenc L.A., Nifantiev N.E., Tikunova N.V. Development Antibodies Against Beta-Glucan of *Candida Albicans* // 12th International Congress of Cell Biology. Prague, 2016. P. 282.
2. Матвеев А.Л., Хлусевич Я.А., Кухаренко Л.А., Нифантьев Н.Э., Тикунова Н.В. Получение моноклональных антител против аналога бета-глюкана клеточной стенки *Candida albicans*, пригодных для использования в диагностике // Научно-практическая конференция «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе». Новосибирск, 2016. С. 208-210.
3. Тикунова Н.В., Матвеев А.Л., Хлусевич Я.А., Кухаренко Л.А., Байков И.К. Моноклональные антитела, направленные к антигенным фрагментам полисахаридов клеточной стенки микопатогенов - бета-глюкану и галактоманнану // V Съезд биохимиков России. Сочи, 2016. С. 166-167.
4. Емельянова Л.А., Матвеев А.Л. Получение моноклональных антител против галактоманнана клеточной стенки *Aspergillus Fumigatus*, пригодных для использования в диагностике // Международная экологическая студенческая конференция «Экология России и сопредельных территорий». Новосибирск, 2016. С. 272.
5. Емельянова Л.А., Матвеев А.Л., Хлусевич Я.А., Байков И.К., Тикунов Н.В. Получение и характеристика моноклональных антител против галактоманнана с целью разработки экспресс тест-систем для выявления антигенов при аспергиллезах // Всероссийская конференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего». Новосибирск, 2017. С. 50.
6. Емельянова Л.А., Матвеев А.Л., Хлусевич Я.А., Байков И.К., Тикунова Н.В. Создание моноклональных антител против бета-глюкана клеточной стенки микопатогенов // Всероссийский Конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXI Кашкинские чтения). Санкт-Петербург, 2018. С. 68.
7. Тикунова Н.В., Матвеев А.Л., Емельянова Л.А., Байков И.К., Хлусевич Я.А. Высокоспецифичные моноклональные антитела для диагностики *Aspergillus fumigatus* // Всероссийский Конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXI Кашкинские чтения). Санкт-Петербург, 2018. С. 119.

Список литературы

1. Brown G.D., Denning D.W., Gow N.A., Levitz S.M., Netea M.G., White T.C. Hidden killers: human fungal infections // *Sci. Transl. Med.* - 2012. - V. 4. - N. 165. - P. 1–13.
2. Мейл Д., Брософф Дж., Рот Д.Б., Ройтт А.. Иммунология: Пер. с англ. М.: Логосфера, 2007. 568 с.
3. Gow N.A.R., Latge J.P., Munro C.A. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function // *Microbiol Spectr.* - 2017. - V. 5. - N. 3. - P. 1–25.
4. Kaplon H., Reichert J.M. Antibodies to watch in 2019 // *MAbs.* - 2019. - V. 11. - N. 2. - P. 219–238.
5. Latge J.-P. Galactofuranose containing molecules in *Aspergillus fumigatus* // *Med. Mycol.* - 2009. - V. 47. - N. 1. - P. S104–S109.
6. Gerbst A.G., Grachev A.A., Ustiuzhanina N.E., Khatuntseva E.A., Tsvetkov D.E., Usov A.I., Shashkov A.S., Preobrazhenskaia M.E., Ushakova N.A., Nifantev N.E.. The synthesis and NMR and conformational studies of fucoidan fragments: VI. fragments with an α -(1-2)-linked fucobioside unit // *Bioorg. Khim.* - 2004. - V. 30. - N. 2. - P. 137–148.
7. Wang Z., Raifu M., Howard M., Smith L., Hansen D., Goldsby R., Ratner D.. Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity // *J. Immunol. Methods.* - 2000. - V. 233. - P. 167–177.
8. Kappe R., Schulze-Berge A. New cause for false-positive results with the Pastorex *Aspergillus* antigen latex agglutination test // *J. Clin. Microbiol.* - 1993. - V. 31. - N. 9. - P. 2489–2490.
9. Mennink-Kersten M.A., Ruegebrink D., Klont R.R., Warris A., Gavini F., Op den Camp H.J., Verweij P.E.. Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity // *J. Clin. Microbiol.* - 2005. - V. 43. - N. 8. - P. 3925–3931.
10. Baker M.. Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies // *Nature.* - 2015. - V. 521. - N. 7552. - P. 274–276.
11. Nualnoi T., Kiro Singh A., Basallo K., Hau D., Gates-Hollingsworth M.A., Thorkildson P., Crump R.B., Reed D.E., Pandit S., AuCoin D.P.. Immunoglobulin G subclass switching impacts sensitivity of an immunoassay targeting *Francisella tularensis* lipopolysaccharide // *PLoS One.* - 2018. - V. 13. - N. 4. - P. e0195308.
12. Mennink-Kersten M.A., Ruegebrink D., Verweij P.E. *Pseudomonas aeruginosa* as a cause of 1,3-beta-D-glucan assay reactivity. // *Clin. Infect. Dis.* - 2008. - V. 46. - N. 12. - P. 1930–1931.
13. McIntosh M., Stone B.A., Stanisich V.A. Curdlan and other bacterial (1-3)-beta-D-glucans // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2005. - V. 68. - N. 2. - P. 163–173.
14. Beauvais A., Fontaine T., Aimanianda V., Latge J.P. *Aspergillus* cell wall and biofilm // *Mycopathologia.* - 2014. - V. 178. - N. 5–6. - P. 371–377.
15. Cui J.D., Qiu J.Q. Production of extracellular water-insoluble polysaccharide from *Pseudomonas* sp. // *J. Agric. Food Chem.* - 2012. - V. 60. - N. 19. - P. 4865–4871.
16. Torosantucci A., Chiani P., Bromuro C., De Bernardis F., Palma A.S., Liu Y., Mignogna G., Maras B., Colone M., Stringaro A., Zamboni S., Feizi T., Cassone A.. Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence // *PLoS One.* - 2009. - V. 4. - N. 4. - P. e5392.
17. Gavin A.L., Barnes N., Dijkstra H.M., Hogarth P.M.. Identification of the mouse IgG3 receptor: implications for antibody effector function at the interface between innate and adaptive immunity // *J. Immunol.* - 1998. - V. 160. - N. 1. - P. 20–23.

Отчет о проверке на заимствования №1



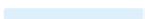
Автор: Новопашина Дарья Сергеевна danov@niboch.nsc.ru / ID: 7007712
Проверяющий: Новопашина Дарья Сергеевна (danov@niboch.nsc.ru / ID: 7007712)
 Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <https://users.antiplagiat.ru>

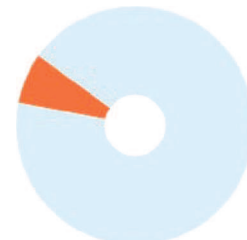
ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 8
 Начало загрузки: 06.09.2019 08:28:18
 Длительность загрузки: 00:00:06
 Имя исходного файла: Емельянова
 Л.А._научный доклад
 Размер текста: 1224 кБ
 Символов в тексте: 46432
 Слов в тексте: 5919
 Число предложений: 636

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
 Начало проверки: 06.09.2019 08:28:24
 Длительность проверки: 00:00:04
 Комментарии: не указано
 Модули поиска: Цитирование, Модуль поиска Интернет

ЗАИМСТВОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
6,67% 	0% 	93,33% 



Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
 Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
 Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
 Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
 Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
 Заимствования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
 Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	1,27%	Материалы конференции	http://vector.nsc.ru	05 Дек 2016	Модуль поиска Интернет
[02]	0,18%	Synthesis and Immunological Studies of Linear Oligosaccharides of β-Glucan As Antigens..	https://doi.org	02 Сен 2018	Модуль поиска Интернет
[03]	0,55%	https://edoc.ub.uni-muenchen.de/20608/1/Wiedemann_Annegret.pdf	https://edoc.ub.uni-muenchen.de	18 Дек 2017	Модуль поиска Интернет
[04]	0,52%	The use of biomarkers and molecular methods for the earlier diagnosis of invasive asper...	https://doi.org	12 Июл 2019	Модуль поиска Интернет
[05]	0,58%	http://soil.msu.ru/attachments/article/2006/%D0%97%D0%B0%D0%B3%D1%80%D1%8...	http://soil.msu.ru	19 Мая 2019	Модуль поиска Интернет
[06]	0%	Nonmolecular Methods for the Diagnosis of Respiratory Fungal Infections	https://doi.org	23 Ноя 2018	Модуль поиска Интернет
[07]	0,61%	Characterization of a novel protective monoclonal antibody that recognizes an epitope ...	https://doi.org	23 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[08]	0,54%	ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА BIFIDOBACTER...	http://mimmun.ru	21 Фев 2017	Модуль поиска Интернет
[09]	0,25%	http://orca.cf.ac.uk/1110095/1/Patin%20EC%20et%20al.pdf	http://orca.cf.ac.uk	07 Авг 2018	Модуль поиска Интернет
[10]	0,42%	Complement is important but not essential in a new mouse model of bullous pemphigo...	https://d-nb.info	15 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[11]	0,38%	Полный текст диссертации (1/6)	http://ssmu.ru	07 Окт 2016	Модуль поиска Интернет
[12]	0,22%	Aspergillus fumigatus morphology and dynamic host interactions	https://doi.org	12 Мая 2018	Модуль поиска Интернет
[13]	0,33%	Бейшова И.С., Чужебаева И.С., Ковальчук А.М., Ульянова В.А. «Разработка тест-сист...	http://ksu.edu.kz	29 Ноя 2018	Модуль поиска Интернет
[14]	0%	Deciphering the structure-immunogenicity relationship of anti-Candida glycoconjugate ...	https://doi.org	29 Июл 2018	Модуль поиска Интернет
[15]	0,3%	https://www.hse.ru/data/2016/10/20/1107824121/%D0%9F%D1%80%D0%BE%D0%B3%...	https://hse.ru	16 Сен 2017	Модуль поиска Интернет
[16]	0%	ISSN 2309-608X www.mdpi.com/journal/jof Review Pneumocystis Pneumonia in Solid-O...	http://mdpi.com	31 Янв 2017	Модуль поиска Интернет
[17]	0,27%	PDF Full-text	http://mdpi.com	08 Сен 2018	Модуль поиска Интернет
[18]	0,26%	Optimization, Purification and Physicochemical Characterization of Curdlan Produced by...	http://biotech-asia.org	09 Июл 2018	Модуль поиска Интернет
[19]	0%	Ю.Н. Козлова, Н.В. Фоменко, В.В. Морозова, И.В. Саранина, А.Ю. Тикунов, Д.А. Ганич...	http://bionet.nsc.ru	01 Мар 2018	Модуль поиска Интернет
[20]	0%	А.Л. Матвеев, Я.А. Хлусевич, И.К. Байков, И.В. Бабкин, Е.П. Гончарова, В.В. Морозова...	http://bionet.nsc.ru	01 Мар 2018	Модуль поиска Интернет

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчет о проверке текста научно-квалификационной работы на
объем заимствования

Емельянова Людмила Александровна

«Конструирование химерных антител против микоантигенов и исследование
их свойств»

Оригинальность работы составляет ____93.33__ %, что соответствует
требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к
защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в
аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.х.н. Д.С. Новопашина