

На правах рукописи

ХЛУСЕВИЧ ЯНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ГРУППОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ
РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ
ИММУНОДОМИНАНТНОГО БЕЛКА Р35 ОРТОПОКСВИРУСОВ:
ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и в Федеральном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

Научный руководитель:

Тикунова Нина Викторовна д.б.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, заведующая лабораторией молекулярной микробиологии

Официальные оппоненты:

Бунева Валентина Николаевна, д.б.н., проф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, главный научный сотрудник лаборатории ферментов репарации

Глушков Андрей Николаевич, д.м.н., проф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии человека СО РАН, директор

Попова Нэлли Александровна, к.б.н., проф.

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, старший научный сотрудник лаборатории регуляции экспрессии генов

Защита состоится «__» декабря 2019 г. в ____ часов
на заседании диссертационного совета ИХБФМ 03.01 при
Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
по адресу: 630090, Новосибирск-90, пр. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «__» октября 2019 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Семейство *Poxviridae* включает в себя сложные ДНК-содержащие вирусы, которые реплицируются в цитоплазме клеток позвоночных и беспозвоночных. Род *Orthopoxvirus* наиболее известен в семействе *Poxviridae*. К этому роду относится большая часть патогенных для человека поксвирусов. Наиболее опасным является вирус натуральной оспы (ВНО), естественная трансмиссия которого была прервана в 1977 году, благодаря применению профилактических прививок вирусом осповакцины (ВОВ). В настоящее время среди циркулирующих ортопоксвирусов наибольшую угрозу для человека представляет вирус оспы обезьян (ВОО), способный вызвать генерализованную инфекцию. До вспышки оспы обезьян среди жителей США в 2003 году полагали, что это заболевание эндемично для районов Центральной и Западной Африки [Reed et al., 2004; Sejvar et al., 2004]. Способность ВОО вызывать эпидемии в отдаленных от Африки регионах, а также непрекращающиеся случаи заболеваний, вызванных другими ортопоксвирусами [Rimoin et al., 2010, Reynolds et al., 2012], привели к возобновлению усилий в разработке новых терапевтических препаратов и вакцин против ортопоксвирусных инфекций [Alkhalil et al., 2009; Earl et al., 2007; Hutson et al., 2009; von Krempelhuber et al., 2010; Parker et al., 2008; Seaman et al., 2010].

Известно, что вакцинация ВОВ способствует формированию длительного иммунитета у вакцинированных людей [Маренникова и Щелкунов, 1998]. Но, давая надежную защиту, осповивание может сопровождаться рядом осложнений, особенно у людей с врожденным или приобретенным иммунодефицитом. Поэтому существует необходимость в разработке специфических средств профилактики поствакцинальных осложнений. В настоящее время таким средством является так называемый вакцинный иммуноглобулин (ВИГ), получаемый из сыворотки крови вакцинированных доноров [Fenner et al., 1989], однако использование препаратов, полученных из человеческой крови, всегда сопровождается определенным риском. Альтернативу ВИГ могли бы составить человеческие моноклональные антитела против ортопоксвирусов. Разработка рекомбинантных антител открывает новые перспективы в этой области. В настоящее время наиболее предпочтительными являются полностью человеческие рекомбинантные антитела (fully human antibodies). Для их создания используют объединение вариабельных доменов антител человека, обладающих целевой активностью, с константными доменами иммуноглобулинов человека нужного изотипа. Один из способов получения целевых вариабельных доменов – их отбор из комбинаторных фаговых библиотек мини-антител человека. Важно, чтобы отобранные вариабельные домены обеспечивали вируснейтрализующие и/или протективные свойства созданных на их основе рекомбинантных антител.

Создание антител против высоко патогенных вирусов сопровождается необходимостью работы в условиях биобезопасности уровня BSL 3 - BSL 4, что накладывает множество ограничений и является ресурсоемким процессом.

Использование непатогенных вирусов на первых стадиях отбора рекомбинантных антител могло бы значительно упростить и ускорить процесс разработки терапевтических антител. Учитывая высокую патогенность ВНО и ВОО, была поставлена задача создания полноразмерных антител человека, нейтрализующих эти вирусы, на основе вариабельных доменов антител, связывающих непатогенный для человека вирус экстремелии (ВЭ).

Ранее сотрудниками ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» совместно с коллегами из Филиала Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова была сконструирована иммунная фаговая библиотека одноцепочечных антител на основе РНК периферических лимфоцитов добровольцев, вакцинированных ВОВ [Дубровская и др., 2007]. Из этой библиотеки были отобраны одноцепочечные антитела человека против вируса оспы коров (ВОК) и ВОВ [Дубровская и Тикунова, 2007; Патент RU2005125994]. Часть из них была способна нейтрализовать инфекционность ВОВ. При этом большинство вируснейтрализующих антител взаимодействовало с белком р35 ортопоксвирусов. Этот белок является одним из основных иммуногенных белков при развитии иммунного ответа в организме человека. Вместе с тем, к началу данного исследования структурная организация белка р35 была мало изучена, не локализованы эпитопы, отвечающие за взаимодействие с вируснейтрализующими антителами.

Цель данной работы – отобрать группоспецифические антитела, нейтрализующие инфекционность патогенных для человека ортопоксвирусов, и локализовать эпитоп, взаимодействующий с этими антителами.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Отобрать из иммунной фаговой библиотеки одноцепочечные антитела человека, направленные к вирусу экстремелии, и оценить их кросс-реактивность при связывании с другими ортопоксвирусами.
2. Исследовать вируснейтрализующую активность отобранных антител в отношении ортопоксвирусов, включая патогенные ортопоксвирусы.
3. Определить белок-мишень для вируснейтрализующих антител.
4. Сконструировать и охарактеризовать полноразмерные антитела человека против ортопоксвирусов.
5. Локализовать эпитоп или эпитопы, отвечающие за связывание с вируснейтрализующими антителами.

Научная новизна и практическая значимость работы. В настоящей работе впервые получены одноцепочечные антитела человека против ВЭ, штамм К1. Определены аминокислотные последовательности полученных антител. Исследовано связывание антител с различными ортопоксвирусами. Показано, что антитела, отобранные против непатогенного для человека ВЭ, способны нейтрализовать *in vitro* вирусную активность высокопатогенного ВНО, штамм Ind-3А. Получены рекомбинантные плазмидные ДНК, обеспечивающие продукцию полноразмерных человеческих антител класса IgG1, способных нейтрализовать ортопоксвирусы. Получены линии эукариотических клеток, стабильно продуцирующая полноразмерные антитела человека, подавляющие

инфекционность ортопоксвирусов *in vitro*. Определен белок-мишень для вируснейтрализующих антител – белок р35 ортопоксвирусов. Сконструированы плазмидные ДНК, на основе которых получена панель штаммов *E. coli*, продуцирующих укороченные варианты белка р35 ортопоксвирусов. Локализован новый вируснейтрализующий эпитоп в составе белка р35 ортопоксвирусов с использованием созданных укороченных белков, а также методом пептидного дисплея. Определена нуклеотидная последовательность, кодирующая белок р35 ВЭ, штамм К1. Показано, что иммунизация мышей укороченным вариантом белка р35 вызывает у них наработку вируснейтрализующих антител.

Выявленная последовательность эпитопа белка р35, отвечающего за взаимодействие с вируснейтрализующими антителами, может быть полезна при создании полиэпитопных вакцин. Полученные полноразмерные антитела человека, после проверки их противовирусных свойств в модельных экспериментах на животных, могут быть использованы для создания иммунотерапевтических средств для предупреждения поствакцинальных осложнений.

Положения, выносимые на защиту:

1. Одноцепочечные антитела, отобранные из иммунной комбинаторной фаговой библиотеки по связыванию с вирусом экстремелии, являются группоспецифическими и способны нейтрализовать различные ортопоксвирусы, включая вирус натуральной оспы.

2. Обнаружен новый вируснейтрализующий группоспецифический эпитоп в составе белка р35 ортопоксвирусов, включающий аминокислотные остатки 15–19 и 232–237, расположенные на петлях ¹³VIDRLPSETFPNVHEHINDQKF³⁴ и ²³¹DNAAKYVEN²³⁹, соответственно, и не включающий глюкозаминогликан-связывающие мотивы.

3. Иммунизация фрагментом белка р35 ортопоксвирусов, содержащим 1–239 аминокислотные остатки, вызывает наработку вируснейтрализующих антител у мышей.

4. Полноразмерные антитела человека fh1A и fh8E, стабильно продуцируемые суспензионными линиями клеток, способны нейтрализовать инфекционность ВОВ *in vitro*.

Апробация работы и публикации. По результатам диссертационной работы было получено 2 патента и опубликовано 5 статей, из которых 4 в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Материалы диссертации были представлены на 9 Российских конференциях и 5 международных конференциях, из них 2: 38-th FEBS Congress (Санкт-Петербург, Россия, 2013); 43rd FEBS Congress (Прага, Чешская Республика, 2018), материалы которых индексируются в Web of Science и Scopus.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов, их обсуждения, заключения и списка литературы. Работа изложена на 155 страницах, содержит 39 рисунков и 9 таблиц. Библиография включает 210 литературных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Отбор из комбинаторной иммунной библиотеки scFv антител, специфичных к вирусу экстремелии, и исследование их свойств

Чтобы получить репертуар специфических к ортопоксвирусам антител, использовали библиотеку фаговых антител, сконструированную ранее на основе РНК периферических лимфоцитов добровольцев, иммунизированных ВОВ [Дубровская и др., 2007]. ВЭ, штамм К-1 был применен для биопэннинга. Этот ортопоксвирус является полностью безопасным для человека, но учитывая высокую степень гомологии разных ортопоксвирусов между собой было сделано предположение, что использование ВЭ для биопэннинга позволит отобрать вируснейтрализующие антитела к различным ортопоксвирусам, в том числе патогенным для человека.

Аффинное обогащение иммунной библиотеки с использованием ВЭ проводили в ходе двух последовательных раундов аффинной селекции (биопэннинга). Для того чтобы исключить отбор фаговых антител на блокирующий агент, для блокирования неспецифического связывания применяли 3% раствор БСА в первом раунде и 3% раствор сухого молока во втором раунде. Поликлональные популяции фаговых антител, полученные после каждого раунда биопэннинга, и исходную фаговую библиотеку тестировали с помощью ИФА по способности связывать ВЭ. В результате было показано значительное увеличение сигнала при связывании антигена фаговой популяцией, полученной после второго раунда, над сигналом, обеспечиваемым исходной библиотекой, что подтвердило ее обогащение фагами, экспонирующими на своей поверхности одноцепочечные антитела (scFv) против ВЭ.

Из библиотеки, полученной в результате второго раунда биопэннинга, методом ИФА было протестировано 96 клонов по способности продуцировать scFv, специфически взаимодействующие с ВЭ. В результате было отобрано 12 положительных клонов, специфически связывающих ВЭ, что составило 12,5 %.

Для определения аминокислотных последовательностей отобранных scFv были секвенированы последовательности кодирующих их генов. В результате анализа были идентифицированы пять различных scFv: 1А, 4Н, 6Н, 8Н и 8Е, которые отличались друг от друга, по меньшей мере, на 13 аминокислотных остатков (ако). Полученные нуклеотидные и соответствующие аминокислотные последовательности анализировали с использованием баз данных IgBLAST. Сравнительный анализ последовательностей полученных нами фрагментов V_H и V_L доменов с имеющимися в банке данных позволил выделить в них гипервариабельные и каркасные районы, а так же определить семейства V-генов, к которым они принадлежат (Таблица 1).

VH-домены всех отобранных scFv принадлежали к семейству иммуноглобулинов человека VH3-9 / D6-6, а VL-домены – к семейству KV1-39 (Таблица 1). Однако степень их гомологии с соответствующими зародышевыми линиями варьировала. Петли CDR_{H3} отобранных scFv демонстрировали общий мотив: **IAA-R--AFDI**. Поскольку CDR3-участки V_H доменов антител, отвечающие за связывание с антигенами имели общий мотив, предположили, что указанные антитела связывали один и тот же эпитоп. Все

последовательности V_L доменов анти-ВЭ антител различались между собой, однако принадлежали к одному и тому же подсемейству 39 семейства V_{k1} .

Таблица 1 – Классификация генов, кодирующих фаговые антитела, отобранные против ВЭ, и сравнение третьих гипервариабельных участков их VH доменов

AT	Vh			Vl		CDR3 Vh
	V	D	J	V	J	
1A	99.0% V3-9	100% D6-6	95.8% J3	99.6% KV1D-39	100% KJ1	GSIAALRHHAFDI
4H	99.0% V3-9	100% D6-6	95.7% J3	98.3% KV1D-39	94.6% KJ4	DRIAA-RRGAFDI
6H	98.7% V3-9	100% D6-6	100% J3	100% KV1D-39	94.4% KJ1	DRIAA-RRGAFDI
8H	99.7% V3-9	100% D6-6	100% J3	99.6% KV1D-39	93.9% KJ1	DRIAA-RRGAFDI
8E	98.3% V3-9	100% D6-6	93.8% J4	94.4% KV1D-39	100% KJ2	DGIAA-RRGYFDY

Нуклеотидные последовательности, кодирующие вариабельные домены антител 1A, 4H, 6H, 8H и 8E, были депонированы в базу GenBank под номерами MG252970, MG252971, MG252972, MG252973 и MG252974 соответственно.

Отобранные антитела 1A, 4H, 6H, 8H и 8E протестировали в реакции перекрестного связывания с BOB, BOK и ВЭ. Инкубирование с фагом-помощником M13K07, не несущим scFv на своей поверхности, служило контролем неспецифичного связывания. Оказалось, что антитела 1A, 4H, 6H и 8H связывали различные ортопоксвирусы приблизительно с равной эффективностью и, следовательно, являлись группоспецифическими (Рис. 1). Антитело 8E несколько хуже связывало BOB и ВЭ, и совсем не взаимодействовало с BOK. Возможно, это антитело направлено к видоспецифическому эпитопу, либо различия в аминокислотных последовательностях белков ортопоксвирусов, а также замены в самом антителе 8E повлияли на эффективность связывания этого антитела.

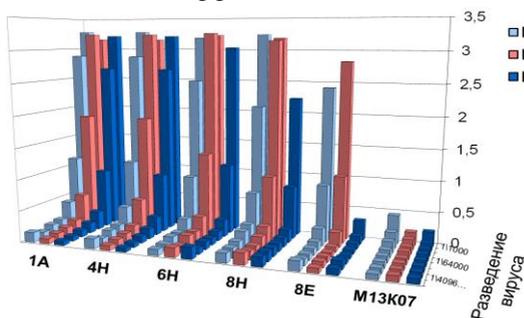


Рис. 1 – Тестирование связывания фаговых антител, отобранных против ВЭ, с BOB, ВЭ и BOK с помощью ИФА (начальная концентрация вирусом 1 мкг/мл, шаг 1:4, концентрация фаговых антител 10^{11} БОЕ/мл)

Определение ортопоксвирусных белков-мишеней для отобранных анти-ВЭ антител

Поиск белков-мишеней фаговых антител, отобранных из иммунной библиотеки по связыванию с ВЭ, осуществляли методом вестерн-блот анализа с использованием лизатов BOB, BOK, ВНО и ВЭ. В результате проведенных

экспериментов было показано, что все анти-ВЭ антитела связывали белок массой около 35 кДа (Рис. 2).

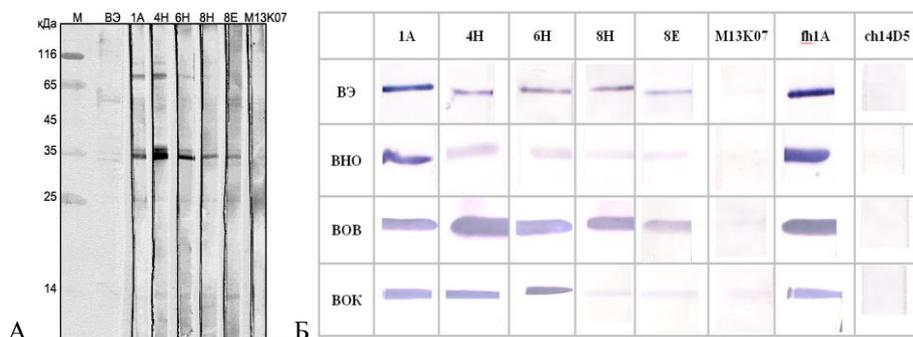


Рис. 2 – Вестерн-блот анализ связывания антител, отобранных против ВЭ, с ВЭ (А) и VНО, VОВ, VОК (Б)

Было сделано предположение, что связываемый белок соответствует основному иммунодоминантному белку ортопоксвирусов, кодируемому ОПТ Н3L VОВ, штамм Копенгаген, (ОПТ J3L ВОК, штамм Гришак, ОПТ I3L VНО, штамм Ind3а, и ОПТ ECTV085 ВЭ, штамм Moscow). Данное предположение было подтверждено методом вестерн-блот анализа с химерным рекомбинантным белком р35-β-Gal ВОК, полученным ранее с использованием ранее сконструированной плазмиды рUR-J3L [Дубровская и др., 2007].

Для визуализации прямого связывания фаговых антител с ортопоксвирусами использовали атомно-силовую микроскопию. Было показано, что фаговое антитело (Рис. 3А) связывало частицы VОВ (Рис. 3Б). Бактериофаг M13K07 не связывался с частицами VОВ (Рис. 3В). Более того, фаговые антитела взаимодействовали с VОВ только своими апикальными концами, на которых экспонированы scFv. Этот факт, а также хаотичное расположение бактериофага дикого типа M13K07 (Рис. 3В) указывали на отсутствие неспецифических взаимодействий между основным капсидным белком р8 бактериофага и частицами VОВ.

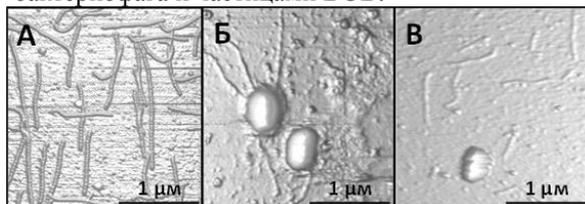
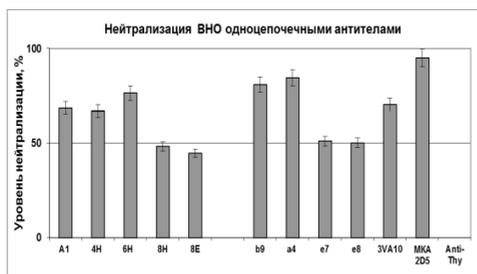


Рис. 3 – Атомно-силовая микроскопия связывания фаговых антител и бактериофага M13K07 с VОВ. Капли анализируемой суспензии фагового антитела 1А (А), фагового антитела 1А, смешанного с VОВ (Б), и

бактериофага M13K07, смешанного с VОВ (В), были нанесены на предметное стекло и оставлены для адсорбции на поверхности. Изображения получали в полуконтактном режиме в атмосферных условиях с использованием алмазоподобного углеродного кантилевера серии NSG. АСМ-изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения Nanoscope Analysis. Масштабная линейка 1 мкм.

Оценка вируснейтрализующих свойств фаговых антител, отобранных против ВЭ и ВОК

Наличие вируснейтрализующих свойств у фаговых антител 1А, 4Н, 6Н, 8Н и 8Е, отобранных против ВЭ, проверяли в реакции ингибирования бляшкообразования ВНО, штамм Ind3А, в культуре эукариотических клеток *Vero E6*. Тестирование вируснейтрализующей активности показало, что фаговые антитела 1А, 4Н и 6Н, обладали вируснейтрализующей активностью в отношении патогенного для человека ВНО. Титры фаговых антител, при которых наблюдалась уменьшение количества бляшек не менее чем на 50%, составили 2×10^{12} БОЕ/мл (Рис. 4 А).



Антитело	ВНО	ВОВ	ВОК	ВОО	ВЭ
b9	+	+	+	+	+
a4	+	+	+	+	+
d2	n/o	+	+	+	+
e7	+	+	+	+	+
e8	+	+	+	n/o	+
3VA10	+	+	+	+	+
g4	-	+	-	-	-
anti-Thy	-	-	-	-	-

Рис. 4 – А. Нейтрализация ВНО фаговыми одноцепочечными антителами в культуре клеток *Vero E6*. Титр фаговых антител – 10^{12} БОЕ/мл, титр ВНО – 200 БОЕ/мл. Б. Вируснейтрализующая активность одноцепочечных антител человека против ортопоксвирусов. В качестве контроля неспецифической нейтрализации использовали фаговое антитело *anti-Thy*, не взаимодействующее с ортопоксвирусами, в качестве положительного контроля – вируснейтрализующее МКА мыши 2D5 [Ichihashi и Oie, 1996].

Кроме того, была проверена вируснейтрализующая активность по отношению к ВНО фаговых антител b9, a4, d2, e7 и e8, отобранных ранее против ВОВ и антитела 3VA10, отобранного против ВОК. Результаты показали, что фаговые антитела b9, a4, e7, e8 и 3VA10 обладали вируснейтрализующей активностью в отношении ВНО (Рис. 4А). Фаговые антитела b9, a4, d2, e7 и 3VA10 подавляли бляшкообразование ВОО на культуре клеток (Рис. 4Б). Титры фаговых антител, при которых наблюдалась нейтрализация бляшкообразования ортопоксвирусов, т.е. уменьшение количества бляшек не менее чем на 50%, составили 2×10^{12} БОЕ/мл.

Исследование дозозависимой активности в реакции нейтрализации ВОО, ВОК, ВОВ и ВНО в культуре эукариотических клеток *Vero E6* проводили для антител 1А и b9 (Рис. 5). Исследование проводили при постоянном титре ортопоксвирусов, который составлял 200 БОЕ/мл для ВНО, 250 БОЕ/мл для ВОО и ВОВ и 320 БОЕ/мл для ВОК, и при последовательных разведениях фагового антитела, начальная концентрация составляла 10^{13} БОЕ/мл, с шагом разведения 1:4. Фаговые антитела 1А и b9 продемонстрировали дозозависимое ингибирование образования бляшек для ВНО, ВОО, ВОК и ВОВ (Рис. 5).

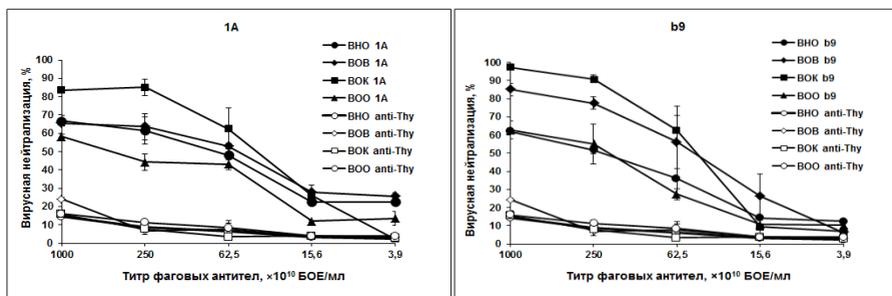


Рис. 5 – Нейтрализация ортопоксвирусов фаговыми одноцепочечными антителами 1А (А) и b9 (Б) и контрольным антителом anti-Thy в культуре клеток Vero E6. Титр ВНО – 200 БОЕ/мл, ВОК – 320 БОЕ/мл, ВОО и ВОВ – 250 БОЕ/мл

Определение последовательности OPT EVM085, кодирующей белок p35 ВЭ (штамм К1)

Секвенирование OPT EVM085, кодирующей белок p35, ВЭ, штамм К1, против которого были отобраны вируснейтрализующие антитела, к началу проведения исследования не было проведено. Результаты проведенного секвенирования показали, что полученная нуклеотидная последовательность гена, кодирующего белок p35 ВЭ, штамм К1, совпала с таковой для ВЭ штамма Moscow. Нуклеотидную последовательность депонировали в базу данных GenBank под номером HM236313.

Получение полноразмерных антител человека против белка p35 ортопоксвирусов fh1A, fh8E, и fhb9

Поскольку некоторые из отобранных одноцепочечных антител обладали вируснейтрализующей активностью, на их основе сконструировали полноразмерные антитела человека. Ранее было получено несколько полноразмерных антител человека против ортопоксвирусов, включая антитело fhb9, способное нейтрализовать инфекционность ортопоксвирусов [Юн и др., 2006]. Эти антитела получали в результате транзientной экспрессии клеток НЕК293Т, ко-трансфицированных плазмидами, несущими гены, кодирующие соответствующие тяжелую и легкую цепи IgG1 человека. При этом использованные плазмиды несли одинаковый ген устойчивости к генетицину. Поскольку в дальнейшем планировалось получать стабильные клоны для продукции полноразмерных АТ, необходимо было, чтобы две используемые для ко-трансфекции плазмиды содержали гены, определяющие устойчивость к различным антибиотикам. Для этого необходимо было переклонировать ген, кодирующий легкую цепь антитела b9 в плазмидный вектор с детерминантой устойчивости к гиромоцину. Кроме того, были сконструированы экспрессионные плазмиды, несущие гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи антител 1А, 8Е. Для этого к генам, кодирующим переменные домены тяжелой и легкой цепей, были соответственно присоединены гены, кодирующие константные домены тяжелой цепи IgG1 и каппа-домен легкой цепи антитела человека. В результате были получены пять плазмидных ДНК: pСНm2-1А, pСНm2-8Е, pСLm4/hygro-1А, pСLm4/hygro-8Е и pСLm4/hygro-b9. На их основе

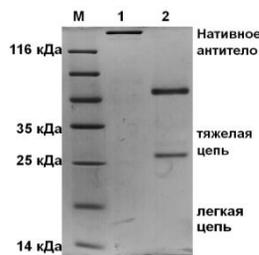
предполагалось получить три полноразмерных антитела fh1A, fh8E и fhb9. Плазмидная ДНК, несущая ген тяжелой цепи антитела b9, была получена ранее.

Пары плазмид, pCHm2-1A и pCLm4/hygro-1A, pCHm2-8E и pCLm4/hygro-8E, а также pCHb9 и pCLm4/hygro-b9, использовали для ко-трансфекции клеток CHO-K1. Культуральную жидкость, содержащую антитела, отбирали и тестировали с помощью ИФА по связыванию с ВОВ. Анализ показал, что в культуральную среду секретировались функционально активные антитела.

На следующем этапе получали препараты очищенных антител fh1A, fh8E и fhb9 методом аффинной хроматографии с использованием белка А. Электрофоретический анализ очищенных препаратов антител выявил высокую степень чистоты и гомогенности и подтвердил, что легкие и тяжелые цепи должным образом объединены в молекулу иммуноглобулина (Рис. 6). Выход каждого из антител составил около 1 мг белка с литра культуральной среды.

Антитело fh1A, как и исходное фаговое антитело 1A, выявляло белок р35 различных ортопоксвирусов методом вестерн-блот анализа (Рис. 2Б). Химерное антитело ch14D5 против гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) [Baikov et al., 2014] использовали в качестве отрицательного контроля.

Рис. 6 – Электрофореграмма в 15% ПААГ антитела fh1A с нативными (1) и разрушенными (2) дисульфидными связями. М – маркер молекулярных масс



Для антитела fhb9 проводили исследование дозозависимой активности в реакции нейтрализации ВОВ в культуре эукариотических клеток Vero E6 (Рис. 7). Концентрация антитела fhb9, при которой наблюдалась нейтрализация бляшкообразования ортопоксвирусов, составила 15 мкг/мл.

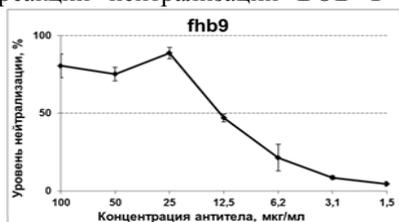


Рис. 7 – Нейтрализация ВОВ антителом человека fhb9 в культуре клеток Vero E6. Титр ВОВ – 320 БОЕ/мл.

Получение штаммов-продуцентов полноразмерных антител в эукариотических клетках линии CHO-S

Преимущество транзientной, т.е. временной, экспрессии заключается в быстром получении рекомбинантных антител, но при этом продуктивность получаемых целевых клеток варьирует от 0.1 до 5 мг/л, что не позволяет проводить «антителозатратные» эксперименты. Убедившись, что сконструированные полноразмерные антитела, полученные с помощью транзientной экспрессии, сохраняли специфичность родительских одноцепочечных антител, на следующем этапе получали стабильные штаммы-продуценты полноразмерных антител в суспензионной линии клеток CHO-S. Для этого, использовали созданную ранее в нашей лаборатории кассетную

плазмиду pCDNA5/FRT-DHFR-CH-CL, содержащую сайт гомологичной рекомбинации FRT, и гены, кодирующие константные домены тяжелой и легкой цепей полноразмерного антитела человека класса IgG1/ каппа, а также сайты для удобного клонирования генов, кодирующих переменные домены тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. Кроме того эта плазида содержит ген гигромицин фосфотрансферазы, обеспечивающий устойчивость к гигромицину Б, без стартового кодона ATG. В эту плазмиду были встроены гены переменных доменов антител 1А и 8Е, и полученные соответствующие плазмиды pCDNA5/FRT-DHFR-full_1A и pCDNA5/FRT-DHFR-full_8E использовали для получения линий клеток, стабильно продуцирующих антитела fh1A и fh8E.

Ранее в нашей лаборатории была получена суспензионная клеточная линия CHO-S/FRT, геном которой содержит FRT-сайт. Эту клеточную линию одновременно трансфицировали сконструированной плазмидой pCDNA5/FRT-DHFR-full_1A и коммерческой плазмидой pOG44, кодирующей флиппазу. Создание стабильного штамма-продуцента полноразмерного антитела человека fh8E делали аналогично и использовали плазмиду pCDNA5/FRT-DHFR-full_8E.

Одно из главных требований при создании штамма-продуцента – это сохранение иммунохимических свойств белка. Для противовирусных антител важно сохранить аффинность и наличие вируснейтрализующих свойств. После аффинной очистки полученных антител fh1A и fh8E, подтверждали принадлежность константных доменов к константным доменам человека (Рис. 8), а также тестировали способность антител выявлять ортопоксвирусный белок р35 с помощью вестерн-блот анализа (Рис. 8, в, г).

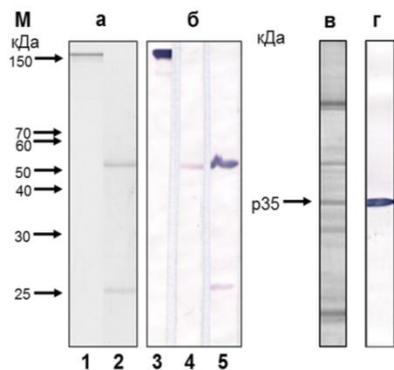


Рис. 8 – Анализ очистки и специфичности антитела fh8E: а – электрофореграмма очищенного полноразмерного антитела fh8E в нередуцирующих (1) и редуцирующих (2) условиях; б – вестерн-блот анализ очищенного антитела fh8E, выявленного поликлональными антителами козы против Fc-фрагмента IgG человека, конъюгированных с щелочной фосфатазой (3 и 4), и поликлональными антителами козы против цельной молекулы (H+L) IgG человека, конъюгированных с щелочной фосфатазой (5); в – электрофореграмма белков вируса BOV L1VP-GFP, разделенных с помощью ПААГ; г – вестерн-блот анализ

белков вируса BOV L1VP-GFP, разделенных с помощью ПААГ и выявленных полноразмерным антителом человека fh8E. М – маркер молекулярных масс

Для подтверждения вируснейтрализующих свойств антитела fh1A и fh8E тестировали в реакции подавления бляшкообразования BOV *in vitro*. Использовали последовательные разведения антител с шагом 1:5, начиная с концентрации 312 мкг/мл. Антитела fh1A и fh8E продемонстрировали способность подавлять инфекционность BOV дозозависимым образом (Рис. 9).

Титр нейтрализации IC50, определенный как разведение антител, при котором наблюдалось 50 % уменьшение количества бляшек, составил около 34 мкг/мл.

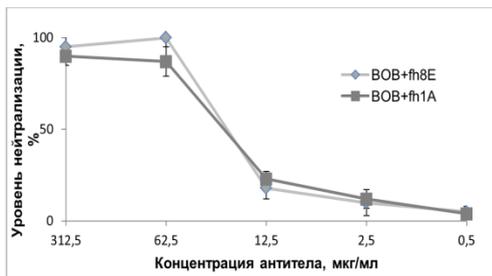


Рис. 9 – Анализ вируснейтрализующей активности различных разведений антител fh1A и fh8E в отношении BOB LIVP-GFP, взятого в разведении 320 БОЕ/мл. Приведены результаты двух независимых экспериментов, выполненных в трех повторах

Для визуализации взаимодействия анти-p35Δ12 антител с клетками, зараженными ортопоксвирусом, использовали лазерно-сканирующую микроскопию (ЛСМ). В экспериментах применяли сконструированный ранее BOB ЛИВП-GFP [Петров и др., 2013]. При размножении этого вируса в цитоплазме зараженных клеток накапливается белок GFP, и при возбуждении светом с длиной волны 488 нм и детекции в диапазоне длин волн 490-530 нм клетки окрашиваются зеленым цветом. Клетки линии Vero E6 заражали BOB ЛИВП-GFP и инкубировали с полноразмерным антителом fh1A, в качестве отрицательного контроля использовали незараженные клетки. Антитела выявляли мечеными Alexa Fluor 633 антителами, направленными к суммарному IgG человека. Этот флуорофор возбуждается светом с длиной волны 633 нм, и при детекции в световой области 630-700 нм меченные объекты окрашиваются красным цветом (Рис. 10). Антитело fh1A выявляло зараженные клетки. Видно, что меченные Alexa Fluor 633 антитела, направленные к суммарному IgG человека, локализуются на поверхности зараженных клеток (окрашены зеленым), и не выявляют незараженные клетки линии Vero E6.

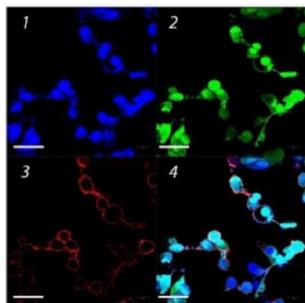


Рис. 10 – Конфокальная микроскопия клеток Vero E6, зараженных BOB ЛИВП-GFP. Монослой зараженных и незараженных клеток инкубировали с полноразмерным антителом человека fh1A. Связавшиеся антитела выявляли антивидовым конъюгатом антител козы против IgG человека с Alexa Fluor 633. Дополнительно препараты окрашивали DAPI для выявления клеточных ядер. Изображения взаимодействия антител с клетками, зараженными BOB ЛИВП-GFP, получали с помощью конфокального микроскопа LSM 710, шкала масштаба изображения соответствует 20 мкм. 1 – сигнал канала DAPI, 2 – сигнал канала GFP, 3 – сигнал канала Alexa Fluor 633, 4 – совмещенное изображение

Конструирование рекомбинантных плазмидных ДНК, обеспечивающих экспрессию укороченных вариантов белка p35 в клетках *E. coli*

С использованием компьютерного моделирования в теоретическом отделе ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» была предсказана третичная структура белка p35, кодируемого ОРТ Н3L ВОВ, а также с помощью алгоритма Veripred предложены его наиболее вероятные эпитопы:

- | | |
|--------------|----------------|
| 1. 29-46 ако | 5. 111-120 ако |
| 2. 53-64 ако | 6. 125-131 ако |
| 3. 71-81 ако | 7. 140-146 ако |
| 4. 90-99 ако | |

Из предсказанных линейных В-клеточных эпитопов белка p35 ВОВ наиболее вероятно за взаимодействие с антителами могли отвечать эпитопы, соответствующие фрагментам 1, 3 и 5. Учитывая это предсказание, а также индекс антигенности Jameson-Wolf и профиль гидрофобности Kyte-Doolittle были сконструированы 13 укороченных вариантов p35 (Рис. 11).

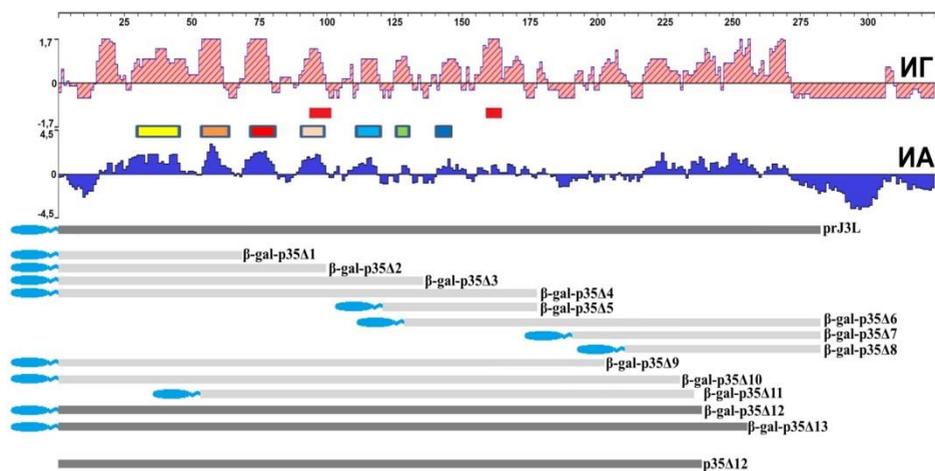


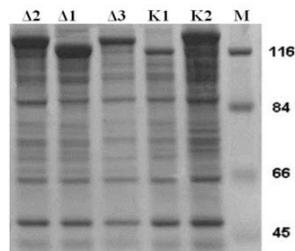
Рис. 11 – Расположение возможных эпитопов белка p35 ВОК и схема укороченных вариантов p35. Профиль индекса антигенности Jameson-Wolf (ИА) показан заштрихованным красным цветом, профиль гидрофобности Kyte-Doolittle (ИГ) – синим цветом, предполагаемые сайты связывания гепарансульфата указаны красными прямоугольниками. Рекомбинантные белки p35Δ обозначены серыми прямоугольниками. Эллипсами слева показаны домены бета-галактозидазы

Для получения рекомбинантных плазмидных ДНК, обеспечивающих экспрессию укороченных вариантов белка p35 в клетках *E. coli*, в качестве вектора использовали плазмиду pUR291. Для встраивания последовательностей генов, кодирующих укороченные варианты белка, были подобраны праймеры таким образом, чтобы экспрессируемые укороченные белки p35ΔN содержали на С-конце 15-20 свободных ако после исследуемого эпитопа, белки Δ5 – Δ8 и Δ11 – на N-конце перед исследуемым эпитопом, что должно было обеспечить

формирование корректной конформации белков, содержащих гипотетические эпитопы. В качестве матрицы использовали плазмиду pUR-J3L, содержащую ген, кодирующий рекомбинантный белок p35 без трансмембранного домена.

Клетки *E. coli*, трансформированные результирующими плазмидами pUR-J3LΔ1 – pUR-J3LΔ13 культивировали в присутствии индуктора лактозного оперона ИПТГ. Оценку продукции гибридных белков проводили с помощью электрофоретического анализа клеточного лизата в 12% ПААГ с SDS (Рис. 12). В качестве контроля использовали лизат клеток, несущих векторную плазмиду pUR-J3L и лизат клеток, несущих плазмиду pUR291. Было показано наличие в индуцированных культурах дополнительных белков с молекулярными массами, превышающими 120 кДа, но не более 150 кДа, что соответствовало диапазону рассчитанных молекулярных масс целевых рекомбинантных белков.

Рис. 12 – Электрофореграмма лизатов клеток *E. coli*/pUR-J3LΔN. K1 – лизат клеток *E. coli*/pUR291, K2 – лизат клеток *E. coli*/pUR-J3L



Исследование антигенных свойств укороченных вариантов белка p35 (OPT J3L BOK)

Способность отобранных против ВЭ вируснейтрализующих фаговых антител 1А, 4Н и 6Н и полноразмерных антител человека fh1A и fh8E связывать укороченные варианты белка p35 исследовали с помощью вестерн-блот анализа. Лизаты клеток *E. coli*, несущие плазмиды pUR-J3L, pUR291 и pUR-J3LΔ1 – Δ13, фракционировали в 12% ПААГ с 0,1% SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. В качестве контроля неспецифического связывания фаговых антител один из стрипов инкубировали с бактериофагом M13K07, полноразмерных антител – с антителом ch14D5. Положительным контролем служила полоска нитроцеллюлозы с лизатом *E. coli*, содержащим белок β-Gal-p35, который ранее выявлялся фаговыми антителами. Контролем неспецифического связывания – нитроцеллюлоза с лизатом *E. coli*, содержащим белок β-Gal (Рис. 13).

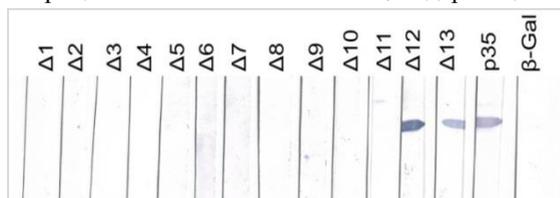


Рис. 13 – Связывание антител, отобранных против ВЭ, на примере антитела fh1A с лизатами клеток *E. coli*, трансформированных плазмидами pUR-J3LΔN, pUR-J3L (p35) и pUR291 (β-Gal)

Фаговые и полноразмерные антитела выявляли белки β-Gal-p35Δ12 и β-Gal-p35Δ13, которые включали 1–239 и 1–255 аао белка p35, соответственно, а также исходный рJ3L (1–282 аао) (Рис. 13). Химерные белки без N-концевых частей (1–54 аао) и те, что короче 239 аминокислотного остатка, не выявлялись фаговыми и полноразмерными антителами. Полученные данные указывали на то, что эпитоп, ответственный за распознавание вируснейтрализующими

антителами, является конформационным, и в связывании, вероятно, участвуют ако, расположенные в двух областях белка р35 (1–54 и 231–239).

Для подтверждения полученных данных был сконструирован рекомбинантный белок р35Δ12 (1–239 ако), который содержал минимальную область р35, распознаваемую выбранными нейтрализующими антителами, но не включал домен бета-галактозидазы (Рис. 11). Клетки *E.coli* XL1Blue, содержащие результирующую плазмиду рQE-р35Δ12, культивировали в присутствии индуктора лактозного оперона - ИПТГ. Оценку продукции гибридных белков проводили с помощью электрофоретического анализа клеточного лизата в 12,5% ПААГ с SDS (Рис. 14 А). Было показано наличие в индуцированной культуре клеток XL1Blue/рQE-р35Δ12 дополнительного белка с молекулярной массой около 30 кДа, что соответствовало расчетной молекулярной массе рекомбинантного белка р35Δ12.

Рекомбинантный белок р35Δ12, наработанный в клетках *E. coli* XL1-blue, очищали из фракции растворимых цитоплазматических белков с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе. Полученные в результате очистки белковые фракции анализировали электрофоретически в 12,5 % ПААГ (Рис. 14Б). Общий выход белка р35Δ12 составил 300 мг из 1 л культуры клеток *E. coli*.

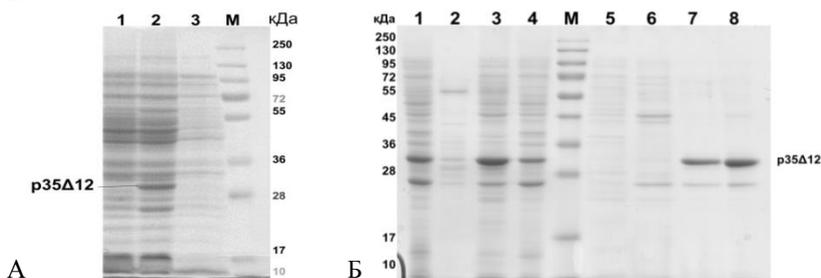
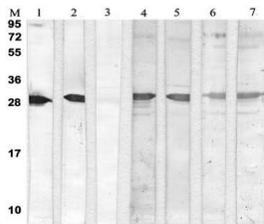


Рис. 14 – Электрофореграмма в 12,5% SDS-ПААГ А. лизатов клеток *E.coli*. 1 – индуцированная культура клеток *E.coli* XL1Blue/pQE30, 2 – индуцированная культура клеток *E.coli* XL1Blue/pQE-р35Δ12, 3 – индуцированная культура клеток *E.coli* XL1Blue; Б. клеточных и белковых фракций *E. coli* XL1Blue/pQE30-р35Δ12. 1 – индуцированная культура клеток *E. coli* XL1Blue/pQE30-р35Δ12, 2 – периплазматическая фракция, 3 – фракция растворимых белков цитоплазмы, 4 – фракция телец включения, 5 – фракция белков, не связавшихся с Ni-NTA, 6 – элюат после 25 мМ имидазола, 7 – элюат после 100 мМ имидазола, 8– концентрированный очищенный белок р35Δ12, М – маркеры молекулярных масс

Исследование антигенных свойств белка р35Δ12 ортопоксвирусов

Связывание очищенного белка р35Δ12 с вируснейтрализующим фаговым антителом 1А, полноразмерным антителом fh1А и сыворотками доноров, вакцинированных ВОВ, которые ранее использовались для создания иммунной фаговой библиотеки, исследовали методом вестерн-блот анализа (Рис. 15). В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку невакцинированного ВОВ донора и химерное антитело ch14D5.

Рис. 15 – Вестерн-блот анализ очищенного белка р35Δ12 с 1 – нейтрализующим фаговым антителом 1А, 2 – fh1A (300 нг), 3 – неспецифическим химерным антителом ch14D5 и 4 - 7 – сыворотками (разведенными 1:200) добровольцев, вакцинированных ВОВ. Массы белкового маркера в килодальтонах показаны с левой стороны геля



Способность рекомбинантного р35Δ12 поддерживать конформацию белка р35 была подтверждена с помощью конкурентного ИФА. Антитело fh1A в концентрации 3,5 нг предынкубировали с различными концентрациями рекомбинантного белка р35Δ12, начиная с 5 мг/мл с шагом 1:2, вносили в лунки с предварительно сорбированным ВОВ и инкубировали, затем проявляли. Результаты показали, что р35Δ12 конкурировало с ВОВ и ингибировало связывание fh1A с ВОВ с 50% максимальной ингибирующей концентрацией 62,5 нг / мл (Рис. 16).

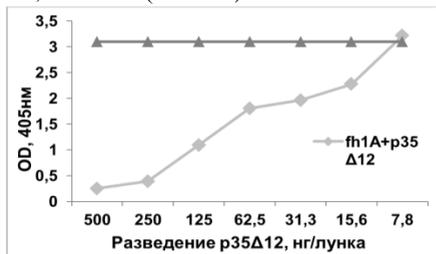


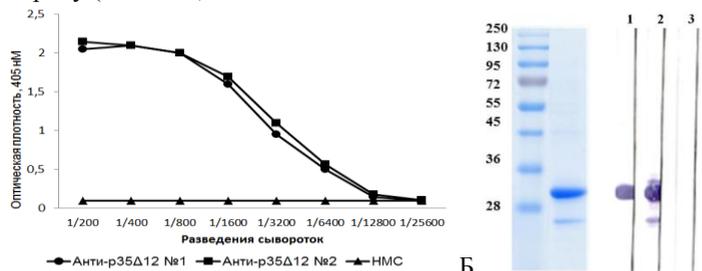
Рис. 16 – Конкурентное связывание рекомбинантного белка р35Δ12 и ВОВ с антителом fh1A. Антитело fh1A в концентрации 3,5 нг предынкубировали с различными концентрациями рекомбинантного белка р35Δ12 и вносили в лунки с предварительно сорбированным ВОВ (200 нг/лунка)

Взаимодействие полноразмерных антител fh1A, fh8E и fhb9 с белком р35Δ12 исследовали методом поверхностного плазмонного резонанса на оптическом биосенсоре ProteOn XPR36. Антитело fh1A иммобилизовали на поверхность GLC чипа, а белок р35Δ12 использовали в качестве аналита. Для антитела fh1A константы ассоциации и диссоциации составили: $k_{off} = (1,74 \pm 0,01) \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ $k_{on} = (4,32 \pm 0,02) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, соответственно. Константа аффинности, рассчитанная как $K_D = k_{off} / k_{on}$, составила 40 нМ. Измерение аффинности антител fh8E и fhb9 проводили аналогично. Константы ассоциации и диссоциации антитела fh8E составили: $k_{off} = (5,6 \pm 0,01) \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ $k_{on} = (4,9 \pm 0,02) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, соответственно; равновесная константа аффинности – 12 нМ. Равновесная константа аффинности антитела fhb9 равнялась 27 нМ. Таким образом, все сконструированные антитела имели наномолярную аффинность, причем $K_D \text{ fh1A} < \text{fhb9} < \text{fh8E}$.

Изучение иммуногенности белка р35Δ12 ортопоксировусов

Мышей BALB/c иммунизировали очищенным белком р35Δ12 дважды в дозировке 10 мкг на мышь с интервалом в 2 недели. Через 7 дней после второй иммунизации из собранных образцов крови отделяли сыворотку и оценивали наличие в ней антител против белка р35Δ12 методами ИФА и вестерн-блот анализа. Данные ИФА связывания белка р35Δ12 сыворотками иммунизированных мышей подтвердили наличие специфических антител в этих

сыворотках (Рис. 17А). Вестерн-блот анализ продемонстрировал, что эти сыворотки выявляли белок p35Δ12, перенесенный на нитроцеллюлозную мембрану (Рис. 17Б).



А. — Анти-p35Δ12 №1 — Анти-p35Δ12 №2 — HMC Б. Рис. 17 – А. Иммуноферментный анализ связывания белка p35Δ12 сыворотками иммунизированных мышей (приведены результаты анализа двух сывороток) и нормальной мышинной сывороткой (НМС). Черными квадратами и кружками отмечены кривые связывания сывороток вакцинированных мышей, треугольниками – НМС. Б. Вестерн-блот анализ очищенного белка p35Δ12. Дорожки в геле: маркер молекулярных масс и концентрированный очищенный белок p35Δ12, Стрипы нитроцеллюлозной мембраны, с перенесенным белком p35Δ12, проявленные: 1 – fh1A, 2 – объединенной сывороткой иммунизированных мышей, 3 – НМС

Для визуализации взаимодействия анти-p35Δ12 антител, находящихся в сыворотках иммунизированных мышей, с клетками, зараженными ортопоксвирусом, использовали ЛСМ. Клетки линии Vero E6 заражали ВОВ ЛИВП-GFP и инкубировали с сыворотками мышей, иммунизированных p35Δ12, в качестве отрицательного контроля использовали НМС. Мышинные антитела выявляли конъюгатом антивидовых антител с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 633(Рис. 18).

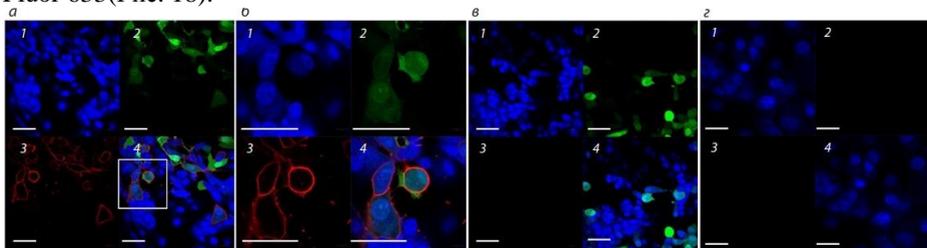


Рис. 18 – Конфокальная микроскопия клеток Vero E6, зараженных ВОВ ЛИВП-GFP. Монослой зараженных клеток инкубировали с сыворотками мышей, иммунизированных белком p35Δ12 (а и б) и с НМС (в). Монослой незараженных клеток инкубированный с сыворотками мышей, иммунизированных белком p35Δ12 (д). Связавшиеся антитела выявляли антивидовым конъюгатом антител козы против IgG мыши с Alexa Fluor 633. Для выявления клеточных ядер препараты окрашивали DAPI. Изображения взаимодействия антител с клетками, зараженными ВОВ ЛИВП-GFP, получали с помощью конфокального микроскопа LSM 710, шкала масштаба изображения соответствует 10 мкм. 1 – сигнал канала DAPI, 2 – сигнал канала GFP, 3 – сигнал канала Alexa Fluor 633, 4 – совмещенное изображение

Сыворотки иммунизированных мышей выявляли зараженные клетки. Видно, что антитела, меченные Alexa Fluor 633 и направленные к суммарному IgG мыши, локализуются на поверхности зараженных клеток (окрашены зеленым), и не выявляют незараженные клетки линии *Vero E6* (Рис. 18).

Для проверки способности рекомбинантного белка р35Δ12 вызывать наработку антител, обладающих вируснейтрализующими свойствами, исследовали вируснейтрализующую активность сывороток иммунизированных мышей. Для заражения клеток линии *Vero E6* использовали вирус ВОВ ЛИВП-GFP. Оказалось, что эти сыворотки, при разведении в 100 раз обладали вируснейтрализующей активностью *in vitro* в отношении ВОВ. Нормальная мышиная сыворотка, полученная от неиммунизированного животного, такой способностью не обладала (Рис. 19).

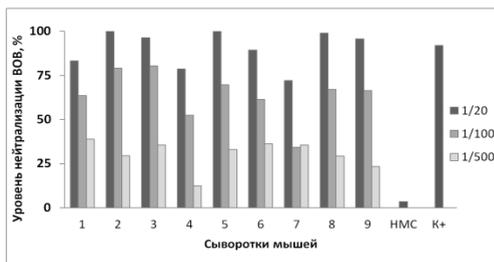


Рис. 19 – Нейтрализация различными разведениями сывороток мышей, иммунизированных белком р35Δ12, бляшкообразования ВОВ ЛИВП-GFP на культуре клеток *Vero E6*. Приведены результаты вируснейтрализующей активности сывороток 9 иммунизированных мышей, а также HMC (отрицательный контроль) и сыворотки многократно вакцинированного ВОВ

ЛИВП добровольца (положительный контроль), разведенными в 20 раз. По оси ОУ приведен уровень нейтрализации, рассчитанный по формуле $N = (V_0 - V_n) / V_0 \times 100 \%$, где V_0 - среднее количество бляшек в контрольных лунках, а V_n - количество бляшек в экспериментальных лунках

Картирование вируснейтрализующего эпитопа с использованием пептидных библиотек

Для более точной локализации вируснейтрализующего эпитопа, из двух комбинаторных фаговых библиотек случайных пептидов, Ph.D.-12 и Ph.D.-C7C (NEB), были отобраны пептиды, связываемые с антителом fh1A, направленным к эпитопу белка р35 ортопоксвирусов. Пептидная библиотека Ph.D.-12 представляет собой популяцию бактериофагов, каждый из которых экспонирует на своей поверхности пептид из 12 аа в составе белка рIII. Библиотека Ph.D.-C7C включает 7-членный случайный пептид, фланкированный парой остатков цистеина, которые обеспечивают образование пептидной петли у N-конца минорного белка р3 бактериофага.

Для обогащения пептидных библиотек Ph.D.-12 и Ph.D.-C7C бактериофагами, имитирующими эпитоп р35, проводили последовательно три раунда аффинной селекции для каждой библиотеки с использованием антитела fh1A (200 нг на лунку). Чтобы исключить отбор фагов на константные домены антитела fh1A, фаговую библиотеку предварительно инкубировали с рекомбинантным антителом ch14D5, имеющим такие же константные домены как и fh1A, но не связывающим белки ортопоксвирусов.

Для отбора бактериофагов, несущих на своей поверхности пептиды, имитирующие эпитопы белка р35, использовали популяции бактериофагов после третьего раунда аффинной селекции. Из обогащенной популяции Ph.D.-12-III на наличие пептидной встройки проанализировали 384 клон, из которых 75 были положительными; из обогащенной популяции Ph.D.-C7C-III – 378 клонов, 46 из которых содержали пептидную встройку. Способность отобранных бактериофагов связывать антитело fh1A подтверждали методом ИФА. В результате было отобрано 15 бактериофагов, несущих на своей поверхности пептиды, из популяции Ph.D.-12-III, и 14 - из популяции Ph.D.-C7C-III. После секвенирования на основе полученных нуклеотидных последовательностей были определены последовательности связавшихся с антителом fh1A пептидов.

Десять различных пептидов были отобраны из библиотеки Ph.D.-12, однако ни один из отобранных пептидов не содержал последовательность, обладающую сходством с последовательностью белка р35. Вероятно, из этой библиотеки отобраны только так называемые пептиды-миметики. Из библиотеки Ph.D.-C7C было отобрано 8 пептидов, 4 из них включали в себя J3L-подобные последовательности, присутствующие в р35Δ12 (Рис. 20), которые узнавались нейтрализующими фаговыми антителами, fh1A и сыворотками вакцинированных доноров (Рис. 15 Б). Среди отобранных пептидов были выделены три мотива: ¹⁵(A/D)uXPS¹⁹, ¹⁹⁰IBuuTAL¹⁹⁶ и ²³²N(S/A)AKYX²³⁷ (Рис. 21).

Последовательность р35	¹³ VIDRLPSETFPNVHENINDQK ³⁴ ACVPSKPLGC (n = 3)
Мотив 1	¹⁵ (A/D)uXPS ¹⁹
Последовательность р35	¹⁹⁰ IRVTALNIVDEIK ²⁰⁴ ACIHSPTALC (n = 1)
Мотив 2	¹⁹⁰ IBuuTAL ¹⁹⁶
Последовательность р35	²³¹ DNAAKYVEH ²³⁹ ACGPTAKYIC (n = 5) ACTYLNSAKC (n = 3)
Мотив 3	²³² N(S/A)AKYX ²³⁷

Рис. 20 – Эпитопное картирование антитела fh1A. Результаты скрининга фаговой библиотеки пептидов, взаимодействующих с антителом fh1A. Выравнивание гомологичных фрагментов белка р35 ортопоксвирусов и пептидов, отобранных из библиотеки Ph.D.-C7C. Количество клонов, продуцирующих отобранные пептиды, указано в скобках. Распознанные мотивы показаны жирным шрифтом. В означает основной ако, X – гидрофобный ако, и соответствует любому ако. Вариабельные ако отмечены звездочками

Согласно трехмерной структуре фрагмента белка H3L BOB (PDB 5EJ0, Singh et al., 2016), мотивы 1 и 3 локализованы на петлях, ¹³VIDRLPSETFPNVHENINDQK³⁴ и ²³¹DNAAKYVEH²³⁹, соответственно; мотив 2, на правильной альфа-спирали ¹⁹⁰IRVTALNIVDEIK²⁰⁴ (Рис. 21). Обе петли и альфа-спираль пространственно доступны для антител, поэтому все выбранные мотивы могут быть вовлечены в образование р35-нейтрализующего эпитопа, ответственного за связывание с антителом fh1A. Делеционные варианты белка р35, не содержащие мотив 1, либо мотив 3, не выявлялись

нейтрализующими антителами, поэтому можно утверждать об их значимости в формировании вируснейтрализующего эпитопа белка р35 ортопоксвирусов. Значимость мотива 2 в формировании нейтрализующего эпитопа не была подтверждена экспериментальными данными с укороченными белками р35.

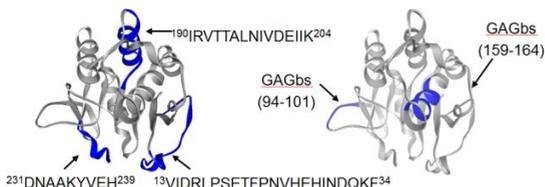


Рис. 21 – 3D-структуры белка H3L BOB (PDB 5EJ0) с указанными предполагаемыми нейтрализующими эпитопами и сайтами связывания гликозаминогликанов (GAGbs). Молекулярные координаты для белка р35 BOB (PDB 5EJ0),

используемого в структурном анализе, были получены из базы данных белков, а затем визуализированы с использованием 3D-Mol Viewer (компо-нент Vector NTI Suite 8.0). Трехмерная структура белка J3L BOK была предсказана с использованием сервиса онлайн-моделирования методом гомологичного выравнивания I-TASSER (<http://zhanglab.ccmh.med.umich.edu/I-TASSER/>)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, из иммунной комбинаторной фаговой библиотеки по специфическому связыванию с вирусом экстремелии были отобраны фаговые антитела, способные нейтрализовать *in vitro* ортопоксвирусы, включая вирус натуральной оспы. Скрининг отобранных одноцепочечных антител по их специфичности и вируснейтрализующей активности позволил выбрать наиболее перспективные и на их основе сконструировать полноразмерные антитела с наномолярной аффинностью, способные нейтрализовать ортопоксвирусы. Аминокислотные остатки, участвующие в связывании с вируснейтрализующими антителами, были локализованы на белке р35 с использованием делеционных вариантов белка р35 и пептидных фаговых библиотек. Данные о таких вируснейтрализующих эпитопах необходимы при разработке вакцин нового поколения. Если сконструированные полноразмерные антитела продемонстрируют анти-ортопоксвирусную активность в экспериментах *in vivo*, их можно будет использовать в качестве компонента терапевтического коктейля. Такой коктейль, содержащий полноразмерные рекомбинантные антитела, специфичные к вируснейтрализующим эпитопам на иммунодоминантных белках IMV и EEV, может улучшить эффективность вакцинного иммуноглобулина (VIG) или заменить этот сывороточный препарат.

Кроме того, был сконструирован рекомбинантный аналог ортопоксвирусного белка р35 - белок р35Δ12, способный вызывать при иммунизации мышей наработку антител, обладающих вируснейтрализующими свойствами. Дальнейшие исследования протективных свойств этого белка *in vivo* позволят сделать заключение о целесообразности использования этого белка или кодирующего гена в разработке вакцин нового поколения.

ВЫВОДЫ

1. Из иммунной комбинаторной фаговой библиотеки отобраны одноцепочечные антитела человека 1А, 4Н, 6Н, 8Н и 8Е против вируса экстремелии, штамм К1; V-сегменты тяжелых цепей этих антител относятся к Vh3 семейству иммуноглобулинов человека, а V-сегменты легких цепей – к семейству каппа 1; антитела 1А, 4Н, 6Н и 8Н обладают способностью к перекрестному связыванию с вирусами осповакцины, оспы коров и экстремелии; антитело 8Е связывает вирус осповакцины и вирус экстремелии, но не вирус оспы коров.

2. Показано, что одноцепочечные антитела 1А, 4Н и 6Н, отобранные против вируса экстремелии, а также антитела b9, a4, e7 и e8, отобранные ранее против вируса оспы коров, и 3VA10, отобранное ранее против вируса осповакцины, способны нейтрализовать инфекционность вируса натуральной оспы; антитела 1А, b9, a4, d2, e7 и 3VA10 способны нейтрализовать инфекционность вируса оспы обезьян.

3. Определено, что отобранные вируснейтрализующие антитела специфически взаимодействуют с белком р35 в составе вирионов вирусов оспы коров, осповакцины и экстремелии, а также с рекомбинантным белком р35 вируса оспы коров.

4. Созданы суспензионные линии клеток, стабильно продуцирующие полноразмерные антитела человека fh1А и fh8Е, которые специфически взаимодействуют с ортопоксвирусами и способны нейтрализовать инфекционность вируса осповакцины на культуре клеток *Vero* Е6.

5. Получены штаммы *Escherichia coli*, продуцирующие укороченные варианты белка р35 вируса оспы коров, штамм Гришак, β -Gal-p35 Δ 1 – β -Gal-p35 Δ 13, и показано, что вируснейтрализующие антитела 1А, 4Н, 6Н, fh1А и fh8Е специфически взаимодействуют с белком β -Gal-p35 Δ 12, содержащим с 1 по 239 аминокислотные остатки белка р35. Методом пептидного фагового дисплея показано, что в связывании вируснейтрализующими антителами участвуют аминокислотные остатки с 15 по 19 и с 232 по 237, расположенные на петлях ¹³VIDRLPSETFPNVHEHINDQKF³⁴ и ²³¹DNAAKYVEN²³⁹, соответственно.

6. Установлено, что иммунизация мышей рекомбинантным белком р35 Δ 12 приводит к наработке вируснейтрализующих антител.

Список основных публикаций по теме диссертации

1. **Хлусевич Я.А.**, Матвеев А.Л., Гончарова Е.П., Байков И.К., Тикунова Н.В. Изучение иммуногенности рекомбинантного фрагмента ортопоксвирусного белка Р35. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. – 23(4). – С. 398-404.
2. **Khlusevich Y.A.**, Matveev A.L., Baykov I.K., Bulychev L., Plyichev I.V., Shevelev G.Y., Morozova V.V., Pyshnyi D.V., Tikunova N.V. Phage display antibodies against ectromelia virus that neutralize variola virus: Selection and implementation for p35 neutralizing epitope mapping. // Antiviral Research. – 2018. – 152. – С. 18-25.
3. Матвеев А.Л., **Хлусевич Я.А.**, Байков И.К., Бабкин И.В., Гончарова Е.П., Морозова В.В., Тикунова Н.В. Создание стабильного штамма-продуцента полноразмерного антитела человека на примере антитела против вируса эктромелии. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. – 21(8). – с. 993-1000
4. Tikunova N.V., Dubrovskaya V.V., Morozova V.V., Yun T., **Khlusevich Y.A.**, Bormotov N., Laman A., Brovko F., Shvalov A., Belanov E. The neutralizing human recombinant antibodies to pathogenic Orthopoxviruses derived from a phage display immune library. // Virus Research. – 2012. – 163(1). – С. 141-150.
5. Байков И.К., **Хлусевич Я.А.**, Матвеев А.Л., Тикунова Н.В. Конструирование кассетных векторных плазмид для получения полноразмерных рекомбинантных антител. // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2013. – Т. 11. – №3. – С. 56-64.
6. **Хлусевич Я.А.**, Тикунова Н.В., Морозова В.В., Булычев Л.Е., Бормотов Н.И., Власов В.В., Сергеев А.Н. Средство для нейтрализации вируса натуральной оспы. Патент на изобретение №2515905 Дата приоритета 10-01-2013. Дата опубликования 20-05-2014.
7. **Хлусевич Я.А.**, Тикунова Н.В., Морозова В.В., Григорьева А.С., Байков И.К., Пьянков О.В. Рекомбинантная плазмидная ДНК рQE-p35d, обеспечивающая синтез рекомбинантного белка р35d вируса оспы коров, штамм бактерий *Escherichia coli* - продуцент рекомбинантного белка р35d вируса оспы коров и рекомбинантный белок р35d вируса оспы коров, используемый для создания тест-систем и конструирования субъединичных вакцин против ортопоксвирусных инфекций. Патент на изобретение №2511037. Дата приоритета 01-08-2012. Дата опубликования 10-04-2014.