

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора

На правах рукописи

Хлусевич Яна Александровна

**Группоспецифические вируснейтрализующие
рекомбинантные антитела против
иммунодоминантного белка р35 ортопоксвирусов:
получение и характеристика**

03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
д.б.н., доцент Н.В. Тикунова

Новосибирск- 2019

Оглавление

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. РОД ОРТОПОКСВИРУСОВ.....	12
1.1.1. Структура и морфогенез ортопоксвирусов	12
1.1.2. Геном ортопоксвирусов	15
1.1.3. Белки ортопоксвирусов.....	18
1.1.4. Основные иммуногенные белки осповакцины	19
1.1.5. Роль отдельных белков в морфогенезе ортопоксвирусов	21
1.2. ЭПИТОПНОЕ КАРТИРОВАНИЕ ВИРУСНЫХ БЕЛКОВ.....	27
1.2.1. Различные типы эпитопов.....	27
1.2.2. Способы картирования эпитопов	30
1.2.3. Эпитопное картирование ортопоксвирусных белков	30
1.2.4. Создание вакцин на основе эпитопов	33
1.3. ФАГОВЫЙ ДИСПЛЕЙ.....	35
1.3.1. Основные принципы фагового дисплея	35
1.3.2. Основные методические этапы фагового дисплея	39
1.3.3. Фаговые библиотеки антител	40
1.3.4. Типы фаговых библиотек антител	41
1.3.5. Пептидный дисплей.....	43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	48
2.1. МАТЕРИАЛЫ.....	48
2.1.1. Реактивы	48
2.1.2. Эукариотические клетки и бактерии	49
2.1.3. Вирусы и бактериофаги	50
2.1.4. Лабораторные животные.....	50
2.1.5. Комбинаторные фаговые библиотеки	50
2.1.6. Ферменты.....	50
2.1.7. Растворы	51

2.1.8. Культуральные среды.....	51
2.1.9. Плазмиды.....	52
2.1.10. Праймеры.....	52
2.2 МЕТОДЫ.....	54
2.2.1. Амплификация библиотеки антител.....	54
2.2.2. Аффинное обогащение библиотеки специфичными фаговыми антителами.....	55
2.2.3. Выделение фаговых одноцепочечных антител.....	55
2.2.4. Иммуоферментный анализ.....	56
2.2.5. Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса.....	57
2.2.6. Определение нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих вариабельные домены иммуноглобулинов.....	58
2.2.7. Электрофоретический анализ белков.....	58
2.2.8. Вестерн-блот анализ белков.....	59
2.2.9. Исследование вируснейтрализующей активности иммуноглобулинов в отношении ортопоксвирусов.....	59
2.2.10. Атомная силовая микроскопия.....	60
2.2.11. Амплификация фрагментов гена J3L.....	60
2.2.12. Ферментативный гидролиз ДНК.....	61
2.2.13. Экстракция фрагментов ДНК из агарозного геля.....	61
2.2.14. Встраивание фрагментов ДНК в векторную плазмиду.....	61
2.2.15. Трансформация клеток <i>E. coli</i> плазмидной ДНК.....	61
2.2.16. Электрофоретическое фракционирование ДНК.....	62
2.2.17. Конструирование плазмидных ДНК, несущих гены тяжелых и легких цепей антиортопоксвирусных антител.....	62
2.2.18. Выделение плазмидной ДНК, не содержащей эндотоксинов.....	62
2.2.19. Трансфекция эукариотических клеток плазмидными ДНК.....	63
2.2.20. Очистка полноразмерных антител с помощью аффинной хроматографии.....	63
2.2.21. Получение штаммов-продуцентов полноразмерных антител в эукариотических клетках линии CHO-S.....	64
2.2.22. Оценка аффинности полноразмерных антител человека к рекомбинантному белку p35Δ12 ВОК с использованием оптического биосенсора ProteOn XPR 36.....	66
2.2.23. Нарботка и очистка белка p35Δ12.....	66

2.2.24. Иммунизация мышей белком p35Δ12 ВОК	68
2.2.25. Исследование взаимодействия антиортопоксвирусных антител с клетками, зараженными ВОВ, методом лазерно-сканирующей микроскопии	68
2.2.26. Амплификация пептидных библиотек	69
2.2.27. Аффинное обогащение пептидных библиотек	70
2.2.28. Выделение фаговых частиц, экспонирующих пептиды	71
2.2.29. Выделение ДНК бактериофагов, несущих пептиды	71
2.2.30. Полимеразная цепная реакция с бляшек и определение нуклеотидной последовательности	72
2.2.31. Статистический анализ	72
2.2.32. 3D-структуры белка p35 ВОВ.....	72
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	73
3.1. ОТБОР ИЗ КОМБИНАТОРНОЙ ИММУННОЙ БИБЛИОТЕКИ SCFV АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ВИРУСУ ЭКТРОМЕЛИИ, И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ СВОЙСТВ.....	73
3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ОТОБРАННЫЕ ОДНОЦЕАОЧНЫЕ АНТИТЕЛА	75
3.3. ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ОТОБРАННЫХ АНТИ-ВЭ АНТИТЕЛ С ОРТОПОКСВИРУСАМИ.....	78
3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРТОПОКСВИРУСНЫХ БЕЛКОВ-МИШЕНЕЙ ДЛЯ ОТОБРАННЫХ АНТИ-ВЭ АНТИТЕЛ.....	78
3.5. ОЦЕНКА ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ СВОЙСТВ ФАГОВЫХ АНТИТЕЛ, ОТОБРАННЫХ ПРОТИВ ВЭ И ВОК.....	82
3.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ОРТ EVM085, КОДИРУЮЩЕЙ БЕЛОК P35 ВИРУСА ЭКТРОМЕЛИИ (ШТАММ K1).....	86
3.7. КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЛАЗМИД, КОДИРУЮЩИХ ПОЛНОРАЗМЕРНЫЕ АНТИТЕЛА ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ БЕЛКА P35 ОРТОПОКСВИРУСОВ FN1A, FN8E, И FNВ9	86
3.8. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ АНТИТЕЛ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ЛИНИИ СНО-К1	89
3.9. ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ АНТИТЕЛ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ЛИНИИ СНО-S.....	92

3.10. КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИДНЫХ ДНК, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЭКСПРЕССИЮ УКРОЧЕННЫХ ВАРИАНТОВ БЕЛКА P35 В КЛЕТКАХ E. COLI.....	99
3.11. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ УКРОЧЕННЫХ ВАРИАНТОВ БЕЛКА P35 (ОРТ J3L ВОК).....	106
3.12. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ БЕЛКА P35Δ12 ОРТОПОКСВИРУСОВ.....	110
3.13. ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ БЕЛКА P35Δ12 ОРТОПОКСВИРУСОВ.....	113
3.14. КАРТИРОВАНИЕ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО ЭПИТОПА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕПТИДНЫХ БИБЛИОТЕК	116
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	130
ВЫВОДЫ	131
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	132
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	134

Введение

Семейство *Poxviridae* включает в себя сложные ДНК-содержащие вирусы, которые реплицируются в цитоплазме клеток позвоночных и беспозвоночных. Род *Orthopoxvirus* наиболее известен в семействе *Poxviridae*. Представители этого рода значительно различаются по широте круга хозяев: так, вирусы натуральной оспы, экстремелии (оспы мышей) и оспы верблюдов инфицируют только один вид, а вирусы оспы обезьян и оспы коров имеют широкий круг хозяев. К роду *Orthopoxvirus* относится большая часть патогенных для человека поксвирусов. Наиболее опасным является вирус натуральной оспы, естественная трансмиссия которого была прервана в 1977 году, благодаря применению высокоэффективных профилактических прививок вирусами оспы коров и осповакцины. В настоящее время среди циркулирующих ортопоксвирусов наибольшую угрозу для человека представляет вирус оспы обезьян, 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 вируса оспы обезьян 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; Baker et al., 2003; Earl et al., 2007; Hutson et al., 2009; von Krempelhuber et al., 2010; Parker et al., 2008; Seaman et al., 2010; Yang et al., 2005].

Известно, что вакцинация вирусом осповакцины способствует формированию длительного иммунитета у вакцинированных людей [Маренникова и Щелкунов, 1998]. Но, давая надежную защиту, оспопрививание 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 (VIG), получаемый из сыворотки крови вакцинированных доноров [Fenner et al., 1989], однако использование препаратов, полученных из человеческой крови, всегда сопровождается определенным риском. Альтернативу вакцинному иммуноглобулину

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 переменных доменов антител человека, обладающих целевой активностью, с константными доменами иммуноглобулинов человека нужного изотипа. Один из способов получения целевых переменных доменов – их отбор из комбинаторных фаговых библиотек мини-антител человека. Важно, чтобы отобранные переменные домены обеспечивали вируснейтрализующие и/или протективные свойства созданных на их основе рекомбинантных антител.

В настоящее время разработано более 250 рекомбинантных антител, обладающих терапевтическим потенциалом для лечения и экстренной профилактики инфекционных заболеваний [Kaplon и Reichert, 2019]. В частности разрабатываются антитела против ортопоксвирусов [McCausland et al, 2010; Tikunova et al, 2001], к которым относятся вирусы натуральной оспы и оспы обезьян. 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 вирусов натуральной оспы и оспы обезьян, была поставлена задача создания полноразмерных антител человека, нейтрализующих эти вирусы, на основе переменных доменов антител, связывающих непатогенный для человека вирус экстромелии.

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 вирусом осповакцины [Дубровская В.В., 2007]. Из этой библиотеки были отобраны одноцепочечные антитела человека против вируса оспы коров и осповакцины [Дубровская и Тикунова, 2007; Патент RU2005125994]. Часть

из них была способна нейтрализовать инфекционность вируса осповакцины. 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. 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. 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*.

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 на их основе.

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 5 международных конференциях: 38-th FEBS Congress (Санкт-Петербург, Россия, 2013); The 17th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (Прага, Чешская Республика, 2014); Biologics & Biosimilars Congress (Берлин, Германия, 2016); Viruses 2018 - Breakthroughs in viral replication (Барселона, Испания, 2018); 43rd FEBS Congress (Прага, Чешская Республика, 2018) и 9 Российских конференциях: XLIV Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, Россия, 2008); Научная конференция «Медицинская геномика и протеомика» (Новосибирск, Россия, 2009); XXII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». (Москва, Россия, 2010); 14-я и 15-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология наука 21 века» (Пущино, Россия, 2010, 2011); V Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Петрозаводск, Россия, 2011), Фундаментальные науки - медицине. (Новосибирск, Россия, 2012); Pharmaceutical and medical biotechnology (Москва, Россия, 2012); Научно-практическая конференция «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе» (Новосибирск, Россия, 2016).

Вклад автора. Обогащение и отбор фаговых антител из иммунной комбинаторной библиотеки антител против вируса экстремелии, исследование их свойств сделаны лично автором. Исследование вируснейтрализующей активности антител в отношении особо опасных ортопоксвирусов проводилось во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» под руководством к.м.н. Е.Ф. Беланова и к.б.н. Л.Е. Булычева. Исследование связывания фаговых антител с ортопоксвирусными частицами с

помощью атомно-силовой микроскопии проводили при участии д.х.н. Д.В. Пышного и к.х.н. Г.Ю. Шевелёва. Конструирование плазмидных ДНК, несущих гены тяжелых и легких цепей антиортопоксвирусных антител, получение полноразмерных антител человека против ортопоксвирусов, получение штаммов-продуцентов полноразмерных антител в эукариотических клетках линии CHO-S, изучение их свойств и поиск белков-мишеней антител сделано лично автором. Вместе с автором в получении полноразмерных антител человека принимал участие А.Л. Матвеев, в оценке аффинности – к.б.н. И.К. Байков. Конструирование рекомбинантных плазмидных ДНК, обеспечивающих экспрессию укороченных вариантов белка р35 в клетках *E. coli*, исследование антигенных свойств укороченных белков, изучение иммуногенности белка р35 Δ 12 ортопоксвирусов сделано автором. В экспериментах по нейтрализации вируса осповакцины, штамм ЛИВП-GFP, принимала участие к.б.н. Е. П. Гончарова. Картирование вируснейтрализующего эпитопа с использованием пептидных библиотек и анализ всех полученных данных сделаны лично автором.

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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Род ортопоксвирусов

Поксвирусы образуют большое семейство, представители которого поражают как позвоночных (подсемейство Chordoroxviridae), так и беспозвоночных (подсемейство Entomoroxviridae). Подсемейство Chordoroxviridae включает 8 родов. Патогенные для человека поксвирусы относятся к пяти из них, причем большая часть принадлежит к роду *Orthoroxvirus*. В род Ортопоксвирусов включены 9 видов, среди которых вирус натуральной оспы (ВНО), вирус оспы обезьян (ВОО), вирус оспы коров (ВОК), вирус осповакцины (ВОВ), вирус оспы верблюдов, вирус экстремелии (оспы мышей), поксвирус енотов, татера поксвирус и поксвирус полевки. Из этих вирусов патогенными для человека являются ВНО и ВОО, а ВОК, ВОВ и вирус оспы верблюдов могут вызывать генерализованную инфекцию у людей с ослабленным иммунным статусом [Маренникова и Щелкунов, 1998; Shchelkunova и Shchelkunov, 2017].

Ортопоксвирусы имеют относительно широкий спектр чувствительных животных, содержат неидентифицированные гены патогенности и способны эффективно рекомбинировать с другими поксвирусами, циркулирующими в природе, что может приводить к возникновению высокопатогенных поксвирусов с широким кругом хозяев [Shchelkunova и Shchelkunov, 2017]. Кроме того, ортопоксвирусы близки антигенно и иммунологически, но в то же время разительно отличаются друг от друга по спектру патогенности, контагиозности и другим показателям. Например, вирус натуральной оспы способен паразитировать в естественных условиях только в организме человека, тогда как вирус оспы коров патогенен по крайней мере для 9 из 18 отрядов млекопитающих [Moss, 2013].

1.1.1. Структура и морфогенез ортопоксвирусов

Ортопоксвирусы имеют ряд биологических особенностей. Эти вирусы имеют сложное строение и крупные размеры, они являются одними из самых больших хорошо изученных вирусов животных. По данным электронной микроскопии, вирионы поксвирусов имеют характерную овоидную или кирпичеобразную форму.

Вирусные частицы представляют собой достаточно сложную структуру, содержащую примерно 75 различных белков [Condit et al., 2006]. Размер вирусных частиц ВОВ, полученных из зараженных клеток, варьирует в пределах 280-450×180-260×140-220 нм [Маренникова и Щелкунов, 1998]. В составе вириона зрелого внутриклеточного вируса (intracellular mature virus, IMV) выделяют несколько структур: двояковогнутую сердцевину (нуклеоид), содержащую нуклеопротеиновый комплекс и покрытую липопротеидной оболочкой, латеральные (боковые) тела, расположенные в местах вогнутостей, и поверхностную мембрану, покрывающую сердцевину и латеральные тела. Зрелый внеклеточный вирус (extracellular enveloped virus, EEV) покрыт дополнительной мембраной.

В отличие от других ДНК-содержащих вирусов, жизненный цикл ортопоксвирусов проходит в цитоплазме клеток хозяина, так как поксвирусы обладают собственным механизмом регуляции репликации и транскрипции [Moss, 2013]. ВОВ проходит довольно сложный морфогенез (Рисунок 1) и формирует три различные инфекционные формы IMV, EEV и связанный с клеткой оболочечный вирус (cell-associated enveloped virus, CEV), а также промежуточную форму - внутриклеточный оболочечный вирус (intracellular enveloped virus, IEV). Процессы связывания вирусных частиц и проникновения их в клетку все еще не изучены до конца, но известно, что ортопоксвирусы могут проникать в клетку как посредством прямого слияния мембран вирионов с плазматической мембраной, так и с помощью эндоцитоза. Серцевина (нуклеоид) высвобождается в цитоплазму и движется по микротрубочкам в перинуклеарное пространство [Carter et al., 2003; Mallardo et al., 2001]. В течение нескольких минут, активируется ранний аппарат транскрипции и инициируется экспрессия ранних генов в вирусной сердцевине. После транскрипции ранних генов, которые составляют примерно половину генома, кэпированные и полиаденилированные молекулы мРНК выходят в цитоплазму и транслируются на полисомах клетки-хозяина. К ранним относят белки, необходимые для репликации вирусного генома и для транскрипции промежуточных мРНК. Транскрипция ранних генов происходит в первые 2 часа после инфицирования клетки и прекращается после того, как происходит «раздевание», вызывающее нарушение целостности нуклеоида и выход вирусного генома в цитоплазму, где затем происходит репликация. Репликация продолжается в течение приблизительно 10 часов после инфицирования;

в результате образуется большой пул геномов (~ 10.000 на клетку, половина из которых участвует в формировании новых вирионов) [Joklik и Becker, 1964; Moss, 2013; Salzman, 1960]. Репликация ДНК служит переключателем, запускающим экспрессию промежуточных, а затем и поздних генов. На каждом этапе экспрессии генов используется уникальный набор *цис*- и *транс*-действующих факторов. Синтез вирусной мРНК, ДНК и белков происходит в цитоплазматических областях известных как "вирусные фабрики" или вироплазма. После экспрессии поздних генов, инициируется сложный процесс морфогенеза вириона [Condit et al., 2006; Smith, 2002].

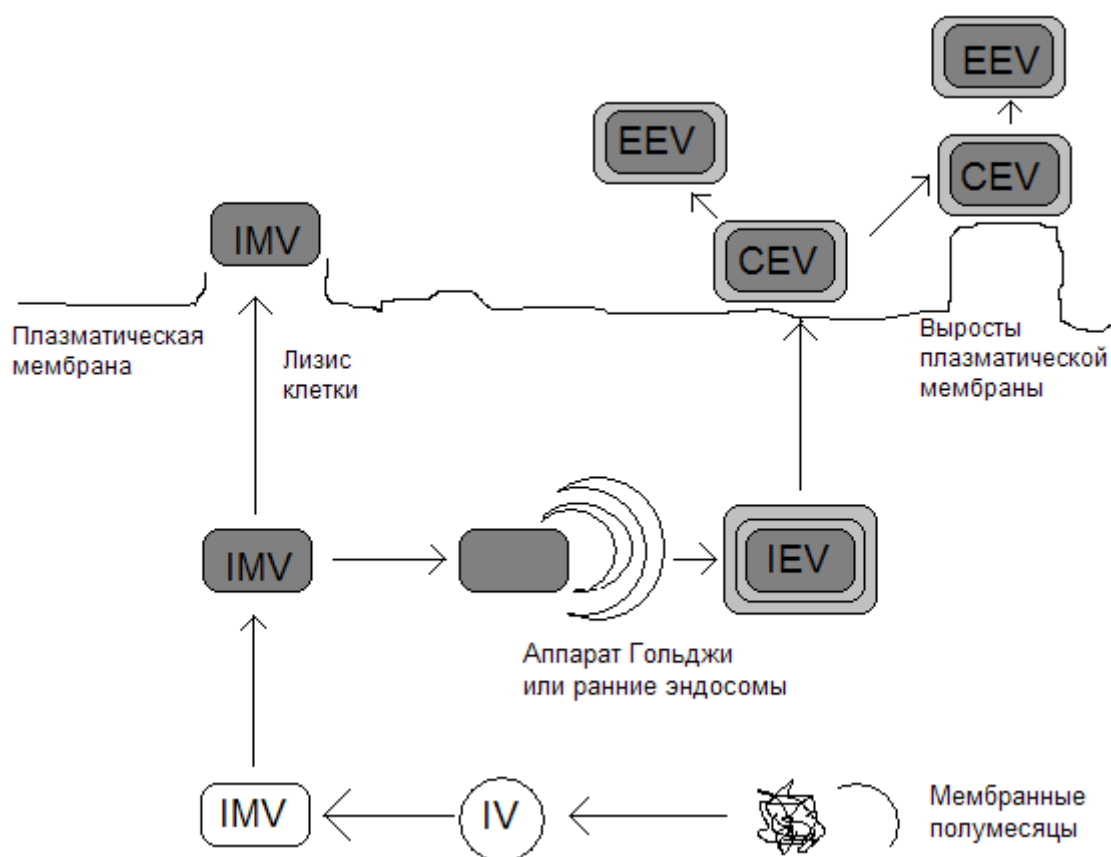


Рисунок 1 – Морфогенез ортопоксвирусов на примере вируса осповакцины. IV – незрелые вирусные частицы, IMV – внутриклеточный зрелый вирус, IEV – внутриклеточный оболочечный вирус, CEV – связанный с клеткой оболочечный вирус, EEV – внеклеточный оболочечный вирус

Скопление гранулярного или фибриллярного электронно-плотного материала, содержащее вирусные белки и ДНК, называют вироплазмой. На начальных этапах

морфогенеза в вироплазме появляются мембранные полумесяцы (crescent-shaped, CR) – жесткие серповидные вирусные структуры, которые состоят из вирусных белков и мембран. Затем эти структуры увеличиваются, и из них формируются шарообразные незрелые вирусные частицы (immature virus, IV), которые заполняются нуклеопротеиновым комплексом. IV, содержащие нуклеопротеиновый комплекс, покрытый липопротеидной мембраной, подвергаются процессу созревания (конденсации вирусного ко́ра, протеолитическому расщеплению ряда капсидных белков и формированию латеральных тел [Moss и Rosenblum, 1973]. В результате образуются IMV, которые представляют собой бóльшую часть вирусного потомства и остаются в клетке вплоть до ее лизиса. Методом двумерного электрофореза в составе вирионов внутриклеточного зрелого ортопоксвируса обнаруживается более 100 полипептидов [Essani и Dales, 1979; Oie и Ichihashi, 1981].

Перед выходом из клетки из зрелых вирусных частиц формируется промежуточная форма вириона IEV путем образования дополнительной двойной мембраны, которая происходит из ранних эндосом или аппарата Гольджи. По сети микротрубочек IEV движутся к плазматической мембране клетки [Hollinshead et al., 2001]. Затем, при слиянии клеточной мембраны с внешней мембраной IEV высвобождаются вирионы, покрытые одной дополнительной оболочкой. При этом часть из них остается на поверхности клеточной мембраны, связываясь с ней пучками актиновых волокон (CEV). Такая форма вирионов участвует в инфицировании соседних клеток. Остальные высвободившиеся вирусные частицы, EEV отвечают за распространение вируса внутри инфицированного организма [Payne, 1980] и в культуре клеток [Law et al., 2002].

1.1.2. Геном ортопоксвирусов

Ортопоксвирусы имеют сложно организованный геном, представленный одной молекулой двухцепочечной линейной не метилированной ДНК длиной от 185 до 210 тыс. п.н. с ковалентно замкнутыми концами (Рисунок 2) [Moss, 2013]. Геномы поксвирусов значительно различаются по соотношению АТ:GC, однако, для ортопоксвирусов характерно очень высокое содержание АТ. Первой среди представителей рода Ортопоксвирус была определена полная нуклеотидная

последовательность ВОВ штамм Копенгаген; он стал прототипным штаммом для ортопоксвирусов [Goebel et al., 1990].

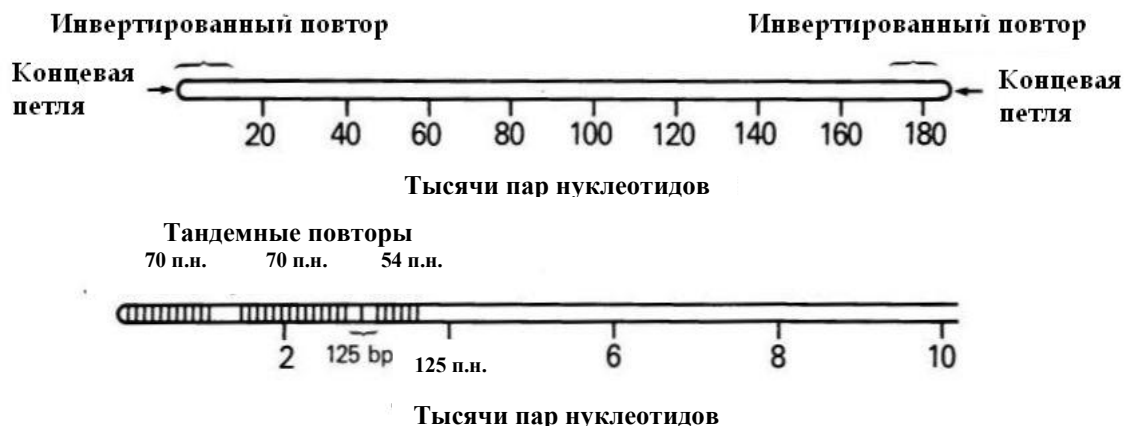


Рисунок 2 – Структура ДНК вируса осповакцины. Показан полный геном и (в увеличенном масштабе) инвертированный концевой повтор, состоящий из 10 тыс.п.н. [Moss, 2013].

Размер ДНК ВОВ (штамм Копенгаген) составляет 191636 п.н., причем на долю А-Т пар приходится 76,6% генома [Goebel et al., 1990]. Жизненно важные гены расположены в центральной консервативной части генома; гены, как правило, не существенные для жизнеспособности вируса, содержатся в концевых варибельных областях. В центральной части генома гены плотно упакованы и их направленность случайна.

На концах генома транскрипция, как правило, ориентирована на теломеры. Кластеризации генов в центральной части генома по времени экспрессии и функции белков не существует. Теломеры двухцепочечной линейной геномной ДНК представляют собой АТ-богатые шпильки, которые содержат неспаренные основания, у ВОВ (штамм Копенгаген) шпилька составляет 104 нуклеотидов и имеет 12 неспаренных оснований (10 на одной цепи, 2 – на другой). Наличие неспаренных оснований характерно для всех поксвирусов, хотя точное число и положение оснований варьируют. Рядом со шпильками расположены петли длиной 87 п.н., которые необходимы и для начала репликации [Du и Traktman, 1996], и расщепления конкатемерных последовательностей генома в процессе репликации [Boyle и

Traktman, 2009; DeLange и McFadden, 1990]. Далее идут тандемные повторы длиной от 54 до 125 нуклеотидов. Таким образом, концевая некодирующая область имеет размер 4 тыс. п. н. Вся эта последовательность, а также часть кодирующей области, входят в состав инвертированного концевого повтора – TIR (terminal inverted repeat), – размером порядка 12 тыс. п. н., хотя его размер может варьировать от штамма к штамму. Протяженные TIR обеспечивают большой мутационный потенциал данного вируса [Маренникова и Щелкунов, 1998; Shchelkunova и Shchelkunov, 2017]. Весь этот регион находится на обоих концах генома [Boyle и Traktman, 2009].

Гены ортопоксвирусов разделяют по времени экспрессии: ранние, промежуточные, поздние и ранне-поздние, которые экспрессируются в течение всего цикла вирусного развития. Сразу после инфицирования клетки экспрессируются ранние гены с помощью вирион-ассоциированной РНК-полимеразы, после репликации вирусной ДНК идет синтез с промежуточных генов. Для экспрессии поздних генов необходимо, чтобы ранние и промежуточные гены экспрессировались и произошла репликация ДНК. Последовательности, кодирующие эти гены непрерывны, что обеспечивает отсутствие сплайсинга из-за цитоплазматической локализации жизненного цикла вируса [Маренникова и Щелкунов, 1998; Moss, 2013; Shchelkunova и Shchelkunov, 2017].

Нумерация открытых рамок трансляции (ОРТ) наиболее часто используется для систематизации генов ортопоксвирусов, при этом для некоторых белков используются названия, присвоенные им ранее. Положение каждого конкретного гена привязывают к определенному *Hind*III-фрагменту геномной ДНК поксвирусов. В результате расщепления эндонуклеазой рестрикции *Hind*III получают фрагменты вирусной ДНК, латинские буквы соответствуют этим фрагментам в порядке уменьшения их размера. В каждом фрагменте нумерация ОРТ идет слева направо. Определенная ОРТ обозначается номером и буквой, которая соответствует фрагменту, содержащему ее иницирующий кодон АТГ. Для указания направления кодирующей последовательности ОРТ присваивается буква L (слева направо) или R (справа налево) [Essani и Dales, 1979; Sarov и Joklik, 1972]. У ВОВ ОРТ называют по названию гомолога в геноме штамма ВОВ Копенгаген.

1.1.3. Белки ортопоксвирусов

Геном ВОВ кодирует более 200 полипептидов, массой от 8 до 200 кДа, примерно половина из них входит в состав вирусной частицы. Методами масс-спектрометрии было показано, что IMV частица содержит более 75 белков [Chung C.S., 2006]. Вирион поксвирусов содержит структурные и функциональные белки. Поскольку весь жизненный цикл поксвирусов протекает в цитоплазме инфицированных клеток, большинство функциональных белков вириона связаны с процессами транскрипции и репликации ДНК. Ранние и промежуточные вирусные белки обладают функциональной активностью, в то время как поздние являются структурными, если они не несут помимо структурной еще какой-либо функциональной активности. По локализации белки вирусной частицы можно разделить на белки сердцевины вириона, белки мембраны IMV и белки дополнительных мембран вириона (IEV/CEV/EEV) [Маренникова и Щелкунов, 1998].

Основными белками сердцевины вириона являются структурные белки, кодируемые генами A3L, A10L, F17R, L4R и A4L [Takahashi et al., 1994]. Известно, что часть структурных белков вириона синтезируется в виде полипептидов-предшественников и подвергается протеолитическому процессингу при сборке вириона.

В настоящее время считается, что с мембранами IMV взаимодействуют приблизительно 12 белков [Fenner et al., 1989]. Основными белками мембраны зрелой вирусной частицы IMV являются белки, кодируемые OPT A26L, A17L, A27L, A13L, A14L, H3L, D8L, L1R, D13L. Часть белков мембраны зрелого вириона являются интегральными и содержат трансмембранные домены, а часть – периферическими и взаимодействуют с мембраной опосредовано через другой белок, либо удерживаясь на поверхности мембраны посредством «липидного якоря». Основными модификациями мембранных белков зрелого вириона являются ацилирование (миристилирование и пальмитирование) [Franke et al., 1989] и фосфорилирование [Derrien et al., 1999]. По данным Rodriguez J. et al, ни один из известных белков мембраны IMV не гликозилирован, хотя часть белков содержит потенциальные сайты гликозилирования [Rodriguez et al., 1997].

Белки дополнительной мембраны внеклеточного зрелого вируса были впервые выявлены Payne L.G. [Payne, 1978]. Считается, что на ней экспонировано 10

полипептидов, пять из которых обладают молекулярным весом 210, 110, 89, 42 и 37 кДа, а остальные пять белков – молекулярным весом от 20 до 23 кДа. Все они, за исключением полипептида 37 кДа, гликозилированы. В настоящее время идентифицированы белки дополнительных липопротеидных оболочек, кодируемые ОПТ A33R, A34R, A56R, B5R, F13L, A36R и F12L. Пять мембранных белков, а именно кодируемые ОПТ A33R, A36R, A56R, B5R и F13L, – пальмитированы [Grosenbach et al., 2000].

1.1.4. Основные иммуногенные белки осповакцины

Вакцинация ВОВ способствует наработке вируснейтрализующих антител, которые присутствуют в сыворотке вакцинированных людей на протяжении более чем 50 лет после иммунизации. Также долго в организме сохраняются В-клетки, являющиеся центральным компонентом гуморального иммунитета, и антигенспецифичные CD4⁺ Т-лимфоциты, необходимые для поддержания гуморального иммунитета и способствующие быстрой реактивации В-клеток [Crotty et al., 2003].

Исследования на животных моделях показали, что антитела играют важную роль в защите организма против ортопоксвирусов. *In vivo* исследования на мышах и кроликах показали, что ЕЕV-специфичные антитела лучше защищают организм от летальных доз поксвирусов, чем антитела специфичные к IMV форме.

Поверхностные белки зрелого внеклеточного вируса (ЕЕV), соответствующие ОПТ B5R и A33R, способствуют наработке протективных антител у животных, но только B5R-специфичные антитела являются вируснейтрализующими. Антитела, обладающие вируснейтрализующей активностью в отношении зрелого внутриклеточного вируса (IMV), направлены против белков, кодируемых ОПТ A27L, L1R, H3L, D8L и A17L [Davies et al. 2014; Galmiche et al. 1999].

При инфицировании ортопоксвирусами в организме нарабатываются антитела против широкого спектра белков, экспрессируемых на разных стадиях инфекции. Вакцинация ВОВ также приводит к наработке большого количества антител, специфичных к различным белкам ортопоксвирусов; наряду с мембранными оболочечными белками, которые доступны, благодаря их расположению на поверхности вирусной частицы, нарабатываемые антитела специфически

взаимодействуют и с коровыми белками вириона [Jones-Trower et al., 2005], и являются единственным способом борьбы с ортопоксвирусными инфекциями. Для предупреждения поствакцинальных осложнений при оспопрививании используют препараты VIG (vaccinia immune globulin). VIG, выделенный из сывороток крови недавно вакцинированных людей, по сути, содержит поликлональную популяцию специфических к ВОВ антител [Hopkins и Lane, 2004].

В работе Demkovicz W. с соавторами исследовали способность сывороток вакцинированных вирусом осповакцины людей и мышей взаимодействовать с белками вируса с помощью вестерн-блот анализа. По данным этих авторов, набор иммунодоминантных белков ВОВ для человека отличался от такового для мыши. Сыворотки вакцинированных людей выявляли белки с молекулярными массами 62, 59, 39, 36 и 32 кДа, а у мышей этот набор был дополнен белками 27, 25, 21, 14 и 11 кДа. Белок 62 кДа и ряд белков с молекулярными массами от 32 до 40 кДа, лучше всего проявляемые антителами сывороток, были идентифицированы с помощью λ gt11 экспрессионной библиотеки ДНК вируса оспы кролика. Белок 62 кДа соответствовал главному продукту протеолиза белка р4а, закодированного ОПТ А10L ВОВ штамма Копенгаген. А белки с примерной молекулярной массой 39, 32, 25 и 14 кДа были соотнесены с ОПТ А4L, D8L, L4R и А27L ВОВ штамма Копенгаген, соответственно [Demkovicz et al., 1992].

При исследовании взаимодействия VIG с белками, образующимися на разных стадиях инфекционного процесса, было показано, что помимо поздних белков, VIG связывается также с белками, продуцируемыми на ранних стадиях инфекции. Также было показано, что наряду с мембранными оболочечными белками, экспонированными на поверхности вириона, нарабатываемые антитела специфически взаимодействуют с коровыми белками вириона [Jones-Trower et al., 2005]. Человеческий VIG выявил 13 белков ВОВ (штамм MVA и Dryvax) с молекулярными массами 95, 77, 62, 59, 42, 40, 37, 35, 33, 28, 25, 18 и 14 кДа. Также в этой работе было показано, что VIG выявлял белки EEV А33R, А56R и В5R [Jones-Trower et al., 2005].

Исследование иммунного ответа у вакцинированных ВОВ людей показало, что и при первичной вакцинации, и при ревакцинации гуморальный иммунный ответ развивается в течение 21 дня. Нарработку АТ измеряли методом ИФА с использованием таких антигенов, как инфицированный вирусом осповакцины

клеточный лизат, белки EEV, соответствующие ОПТ A33R, A56R и B5R, и белки IMV, соответствующие ОПТ A27L, L1R и H3L. Сильный ответ был зафиксирован против белков A33R, A56R, B5R, A27L, H3L и лизата инфицированных клеток. Уровень L1R-специфичных антител был очень низким, в то время как у животных продукт гена L1R индуцирует наработку протективных и вируснейтрализующих антител. Была показана корреляция между уровнем антител, специфичных к B5R, и степенью нейтрализации EEV *in vitro*. Также было показано, что антитела, нейтрализующие EEV, направлены против единственного антигена (B5R), а IMV-нейтрализующие антитела узнают и p14 (ОПТ A27L), и p35 (ОПТ H3L). Причем добавление p14 или p35 незначительно уменьшает титр нейтрализации, тогда как добавление инактивированных IMV вирионов полностью блокирует нейтрализационную активность человеческой сыворотки, что предполагает наличие других IMV мишеней, например, продуктов генов D8L или A17L [Pütz et al., 2006].

В работе Meng X. [Meng et al., 2011] изучали иммунный ответ на ортопоксвирусную инфекцию у мышей путем получения и характеристики гибридом В-клеток мышей, иммунизированных вирусом осповакцины. Антитела 66 гибридом были способны узнавать 11 белковых антигенов BOB – D8L, A14L, WR148, D13L, H3L, A56R, A33R, C3L, B5R, A10L и F13L. Все, кроме C3L, ранее были определены в качестве основных антигенов BOB в протеомных исследованиях с использованием микрочипов, содержащих рекомбинантные белки BOB, которые получали в прокариотических системах экспрессии [Davies et al., 2005a, 2007, 2008]. Кроме того, с помощью микрочипов были обнаружены антитела еще к 15 ортопоксвирусным белкам, большинство из которых являются компонентами вириона и относятся к классу поздних вирусных белков [Davies et al., 2007].

1.1.5. Роль отдельных белков в морфогенезе ортопоксвирусов

Белок массой 62 кДа, кодируемый ОПТ **A10L**, – мажорный белок сердцевины вириона (до 14% веса), необходимый для упаковки ДНК в вирион и для процессинга белков, кодируемых ОПТ A3L и L4R [Heljasvaara et al., 2001]. Он формирует комплексы с коровым белком p39 (продуктом гена A4L), а также взаимодействует с белком 4b. Вероятно, эти взаимодействия необходимы для образования структур сердцевины вириона.

Белок р39, кодируемый ОРТ **A4L**, образует белковую оболочку сердцевин. Впервые он был идентифицирован [Маа et al., 1987] как высокоиммуногенный белок, антитела к которому сохраняются в организме вакцинированных людей многие годы. При биохимической экстракции вирионов детергентами и ДТТ этот белок обнаруживается как во фракции коровых частиц, так и в мембраносодержащей фракции [Pedersen et al., 2000]. Предполагается, что р39 находится на поверхности коровых частиц и взаимодействует с белками внутренней мембраны IMV, образуя комплекс с белком р4а [Pedersen et al., 2000].

Мажорный ДНК-связывающий белок (до 6.5%) с молекулярным весом 25 кДа, кодируемый ОРТ **L4R**, необходим для правильной упаковки ДНК в вирион. При его отсутствии инфекционность частиц снижается на 97% [Wilcock и Smith, 1994; 1996]. Возможно, этот белок не является иммунодоминантным для иммунной системы человека [Demkovicz et al., 1992.].

ОРТ **A33R** кодирует белок мембраны с рассчитанным молекулярным весом 20,5 кДа, но при электрофоретическом разделении вирусных белков в ПААГ данный полипептид соответствует 23-28 кДа. Причиной увеличения молекулярного веса является N- и O-гликозилирование аминокислотных остатков (ако) [Payne, 1992], ацилирование белка [Grosenbach et al., 2000] и его фосфорилирование по Ser-, Thr-остаткам аминокислот [Wollfe et al., 2001]. Известно, что при делеции гена A33R EEV ВОВ полностью теряет устойчивость к нейтрализации поликлональными антителами, полученными при иммунизации животных недеletionным вариантом вируса [Law et al., 2002].

ОРТ **A56R** кодирует белок с молекулярным весом 85-89 кДа - гемагглютинин (НА), существование которого у вируса осповакцины было впервые показано еще в середине XX века [Nagler, 1942]. Гемагглютинин обнаруживается на поверхности инфицированных клеток и в составе мембраны EEV. ОРТ A56R не является жизненно необходимой для вируса, поскольку известно, что не все штаммы ВОВ экспрессируют гемагглютинин. Делетирование гена A56R не влияет на морфогенез вируса, размер образуемых бляшек или продукцию EEV [Flexner et al., 1987]. Функция гемагглютинина в жизненном цикле вируса до сих пор не выяснена.

ОРТ **B5R** кодирует пальмитированный белок, необходимый для окружения зрелой вирусной частицы дополнительной мембраной. При делеции по гену B5R

выход ЕЕV формы понижен в 5-10 раз [Engelstad и Smith, 1993]. Этот белок содержит четыре коротких последовательных повтора (SCR-short consensus repeats), характерных для белков контроля комплемента. В ходе посттрансляционного процессинга от белка, кодируемого ОРТ В5R, отщепляется N-концевой сигнальный пептид, а часть белковых молекул разрезается еще и рядом с трансмембранным доменом, в результате чего образуется фракция секретлируемого белка с молекулярным весом 35кДа [Martinez-Pomarez et al., 1993]. Антитела к этому белку обладают вируснейтрализующей активностью [Galmiche et al., 1999]. В5R известен как главная мишень ЕЕV-нейтрализующих антител в ВИГ, а также как единственная мишень ЕЕV-нейтрализующих АТ после оспопрививания [Pütz et al., 2006].

Белок р32 (ОРТ **D8L**) – иммунодоминантный белок внешней мембраны, образующий димеры. Он обеспечивает инфекционность IMV за счет связывания с хондроитинсульфатом клеточной мембраны. Сыворотка, полученная к N-концевому домену белка р32, обладает вируснейтрализующими свойствами [Hsiao et al., 1999]. Отсутствие данного белка приводит к снижению инфекционности на 90% [Maa et al., 1987].

Белок массой 14 кДа кодируется ОРТ **A27L**. Это мажорный периферический белок внешней мембраны IMV, необходимый для образования внеклеточного оболочечного вириона, для присоединения вируса к инфицируемой клетке и слияния вирусной и клеточной мембран [Demkovicz et al., 1992; Rodriguez et al., 1993]. р14 обеспечивает инфекционность ортопоксвирусов за счет связывания с гепаран сульфатом клеточной мембраны. Данный белок формирует комплексы с белками р16 и р21. В ходе иммунного ответа против р14 нарабатываются вируснейтрализующие антитела [Chung et al., 2006]. Мыши, иммунизированные рекомбинантным р14, защищены от смертельной внутрибрюшинной инфекции ВОК [Lai et al., 1991].

ОРТ **A17L** кодирует белок с молекулярным весом 21кДа. р21 - мажорный интегральный белок мембраны, образующий димеры; необходим для образования мембранных полумесяцев на начальных этапах морфогенеза и для проникновения вируса в клетку [Rodriguez et al., 1993]. Предполагается, что р21 пронизывает мембрану зрелого вириона в нескольких местах, и его N-концевой фрагмент экспонирован в цитоплазму, доказательством чего является наличие

вируснейтрализующих антител, полученных к N-концевому фрагменту белка p21 [Wallengren et al., 2001]. Кроме того, он служит мембранным якорем для белка p14.

ОРТ **L1R** кодирует мембранный белок с молекулярным весом 25 кДа. L1R необходим для обеспечения жизнеспособности вируса в культуре клеток. Отсутствие ОРТ L1R в вирусном геноме приводит к прекращению вирусного морфогенеза, предотвращая формирование зрелых вирионов. Миристилирование является необходимой модификацией p25; неацилированный белок в состав вириона не включается [Ravanello и Hruby, 1994]. Данный белок необходим для проникновения вируса в клетку, что подтверждается наличием вируснейтрализующих антител к нему [Aldaz-Carroll et al., 2005; Ichihashi и Oie, 1996; Pütz et al., 2006]. p25 - основная цель нейтрализующих антител у мышей, но второстепенный компонент человеческого гуморального иммунного ответа [Benhnia et al., 2008].

Еще одним иммуногенным белком, индуцирующим наработку вируснейтрализующих антител, является белок с молекулярной массой 35 кДа, закодированный ОРТ **H3L**. Соответствие данного белка (324 а.к.) гену H3L было впервые определено Зиновьевым с соавт. [Zinoviev et al., 1994]. ОРТ H3L чрезвычайно консервативна среди ортопоксвирусов. Известно, что белок p35 является иммунодоминантным антигеном как для иммунизированных лабораторных животных, так и для вакцинированных вирусом осповакцины людей. Данный белок выявляется человеческим VIG [Jones-Trower et al., 2005]. Иммунизация рекомбинантным аналогом белка p35 вызывает наработку вируснейтрализующих антител у иммунизированных мышей и защищает их в случае заражения летальной дозой вируса. Таким образом, антитела, специфические к данному белку, могут обладать вируснейтрализующими и протективными свойствами [Benhnia et al., 2008; Davies et al., 2005b; Demkovicz et al., 1992].

Известно, что белок p35, экспрессируется на поздних стадиях инфекции, накапливается в цитоплазматических вирусных фабриках, изначально ассоциирован с вироплазмой и встраивается в мембрану вириона посттрансляционно на стадии созревания вирусной частицы [da Fonseca et al., 2000]. Посттрансляционное взаимодействие с мембраной характерно для мембранных белков, содержащих С-гидрофобный домен в качестве мембранного якоря. Наличие такого домена показано для белка p35. Известно, что этот белок обладает способностью связываться с

поверхностью клетки через гепаран сульфат (гликозаминогликан на поверхности клеток) и, таким образом, участвует в процессе проникновения вирусной частицы в клетку (подобное свойство отмечено также для белков, кодируемых OPT D8L и A27L) [Ichihashi и Oie, 1988; Hsiao et al., 1999; Vázquez и Esteban, 1999].

При делеции OPT H3L ВОВ происходит уменьшение размера вирусных бляшек в культуре клеток (что свидетельствует о снижении репликации вируса или о нарушении cell-to-cell распространения), кроме того титры IMV и EEV-форм снижаются в 10 раз, инфекционность таких вирионов уменьшается [Lin et al., 2000]. Результатом отсутствия H3L в геноме является аттенуация вируса *in vivo*, частичная блокировка вирусного морфогенеза на стадии созревания вирусных частиц и аккумуляция незрелых вирионов, вироплазм и вирусных полумесяцев в цитоплазме. Показано, что р35 задействован в морфогенезе вируса на стадии, следующей за процессингом коровых белков р4b и р4a. Таким образом, данный белок выполняет двойную функцию в жизненном цикле вируса: он задействован в присоединении вириона к клетке и в процессе вирусного морфогенеза. Однако отсутствие белка р35 не нарушает локализацию в мембране других белков, кодируемых генами A27L, D8L и L1R [da Fonseca et al., 2000].

В работе Davies D. et al [Davies et al., 2005b] было высказано предположение, что белок р35 является основным иммунногенным белком при развитии иммунного ответа на ортопоксвирусную инфекцию в организме человека. Эти данные подтверждаются исследованиями, в ходе которых было показано, что большинство вируснейтрализующих одноцепочечных антител, отобранных из иммунной комбинаторной библиотеки, сконструированной из антител, продуцируемых лимфоцитами доноров, вакцинированных ВОВ, были направлены против белка р35. При этом одна часть отобранных антител связывалась с линейными эпитопами р35, а другая взаимодействовала только с конформационными эпитопами белка [Дубровская и Тикунова., 2007].

В работе Benhnia M.R. было показано, что белок р35 является иммуннодоминантным белком ВОВ, главной целью нейтрализующих АТ при гуморальном иммунном ответе у человека. Очищенный человеческий анти-H3L IgG достаточен для нейтрализации ВОВ; однако, истощение или блокада анти-H3L антител не приводят к существенному сокращению нейтрализации, демонстрируя,

что анти-НЗЛ IgG не необходим привитым людям (или мышам) для нейтрализации IMV. Сопоставимые результаты были получены для человеческого (и мышинного) анти-L1R IgG и даже для анти-НЗЛ и анти-L1R IgG в комбинации. По данным этих авторов 74% вакцинированных были серопозитивны на анти-НЗЛ IgG, в то время как 100 % вакцинированных имели в сыворотке нейтрализующие антитела против ВОВ [Benhnia et al., 2008].

Недавно был выполнен рентгеноструктурный анализ белка р35 вируса осповакцины с разрешением 1,9 Å. Белок р35 выглядит как гликозилтрансфераза, семейство ферментов, которые переносят молекулы углеводов к различным акцепторным субстратам. Как и гликозилтрансферазы, р35 связывает UDP-глюкозу, и для этого связывания требуется Mg^{2+} . Мутация гликозилтрансферазоподобного мотива, связывающего ион металла, в р35 значительно снижает его связывание с UDP-глюкозой. С помощью проточной цитометрии было показано, что р35 связывается с поверхностью человеческих клеток, при этом с клетками, у которых дефицит гликозаминогликанов на поверхности, связывается значительно хуже. Благодаря связыванию гепаран сульфата и активности гликозилтрансферазы р35 может участвовать в жизненном цикле поксвирусов [Singh et al., 2016].

Кристаллическая структура белка р35 вируса осповакцины представляет смешанную $\beta / \alpha / \beta$ -складку, состоящую из девятицепочечного β -листа, окруженного α -спиралями. Девятицепочечный β -лист состоит из тяжей в порядке $\beta 6, \beta 7, \beta 9, \beta 5, \beta 8, \beta 4, \beta 1, \beta 3$ и $\beta 2$, и все из них, кроме $\beta 7$ и $\beta 8$, ориентированы параллельно друг другу. Структура р35, полученная Singh K. с соавторами, включала с 4 по 34 аао и с 60 по 240 аао, и ион Mg. Белок р35 содержит два цистеина, Cys86 и Cys90, которые не связаны дисульфидной связью. Участок между 34 и 60 аао не был разрешен из-за неупорядоченности структуры этого фрагмента [Singh et al., 2016].

Вместе с тем к настоящему времени не локализованы эпитопы, отвечающие за взаимодействие с вируснейтрализующими антителами.

У разных видов ортопоксвирусов ОПТ, кодирующие белок р35, высоко консервативны, но при этом имеются некоторые различия. Последовательность белка р35 составляет 324 аао для большинства ортопоксвирусов, и 325 аао для ВНО. и является высоко гомологичной. ОПТ, кодирующие белок р35 у разных ортопоксвирусов, называются по-разному, так у ВОВ и ВОО это ОПТ НЗЛ, у ВОК –

I3L, у ВНО – I3L. Для ВЭ не используют классическую систему классификации ОРТ, белок р35 кодируется ОРТ EVM085.

1.2. Эпитопное картирование вирусных белков

Антитела – эффективный способ защиты при профилактике инфекционных заболеваний. Очень мощные нейтрализующие антитела могут «перехватить» вирус до того, как он свяжется с клеткой-мишенью, и инактивировать его. Эта способность основана на специфичном узнавании эпитопов антителами.

1.2.1. Различные типы эпитопов

Эпитоп (англ. epitope) или антигенная детерминанта – часть макромолекулы, которая распознается рецепторами В- и Т-лимфоцитов. В-клеточный эпитоп – часть антигена, которая вовлечена в его взаимодействие с антителом или рецепторами В-клеток, в случае Т-клеточного эпитопа, с рецептором Т-клеток [Ройт, 2007]. Хотя другие химические молекулы – нуклеиновые кислоты и углеводы, тоже могут выступать в качестве антигенов, термин "эпитопное картирование" обычно относится к антигенам белковой природы, и обозначает процесс локализации эпитопа на поверхности белка или в его аминокислотной последовательности. Понимание принципов структуры и сборки белка и знание природы иммунного ответа необходимы для правильной интерпретации результатов экспериментов по эпитопному картированию.

Эпитопное картирование было проведено при попытке определения всех главных участков на поверхности белка, которые могли быть выявлены при гуморальном иммунном ответе, и получения “эпитопной карты” белковых антигенов [Atassi, 1984]. Эта информация могла бы быть очень полезной, например, при производстве противовирусных вакцин. Подразумеваемые в данном случае эпитопы – это фиксированные и конкретные структуры на поверхности белка, которые малочисленны и способны уникально стимулировать иммунную систему. Даже если это верно для белков в нативной конформации, это – ограничение, наложенное в значительной степени структурой белка, а не иммунной системой, поскольку дополнительные эпитопы были показаны для развернутых белков. Этот вид “эпитопной карты” также не различает антигенность (способность узнаваться

определенным антителом) и иммуногенность (способность продуцировать антитела в организме).

Вероятнее всего, эпитопы должны быть определены их антигенностью. Это существенно для различия конформационных (continuous, "прерывистых", "составных") эпитопов, в которых аминокислоты далекие друг от друга в последовательности белка сближаются при сворачивании белка, и линейных (discontinuous, "непрерывных", "последовательных") эпитопов – простых последовательностей пептида. Как правило, эпитопы белков классифицируют на непрерывные или прерывистые. Различие между этими двумя типами эпитопов не четкое, поскольку прерывистые эпитопы часто содержат короткие сегменты, состоящие из нескольких смежных остатков, которые способны связываться с антителами и могут быть определены как непрерывные эпитопы [Mahy и van Regenmortel, 2009].

Поскольку антигены вирусных белков имеют сложную структуру из-за четвертичной структуры вирионов, различают два дополнительных типа вирусных эпитопов, известных как криптотопы и неотопы. Криптотопами называют эпитопы, которые скрыты внутри целого, собранного капсида. Они расположены на поверхности белковых субъединиц, которые становятся недоступными после сборки вирионов, и могут быть антигенно активным только после диссоциации или денатурации вирионов. Неотопами называют эпитопы, которые являются специфическими для четвертичной структуры вирионов и которые отсутствуют в отдельных белковых субъединицах. Неотопы возникают либо за счет конформационных изменений в мономерах в результате межсубъединичных взаимодействий или в результате сближения соседних ато. С использованием моноклональных антител были определены и неотопы, и криптотопы многих вирусов, что позволило детально проанализировать антигенные структуры. Так, например, белок gp160 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) в тримерной форме содержит неотопы, которые не присутствуют в мономерной форме, однако имеют важное значение для индукции продукции нейтрализующих антител [Mahy и van Regenmortel, 2009; Schutkowski и Reineke, 2009; Wyatt et al., 1998a; Wyatt и Sodroski, 1998b]

Частям конформационных эпитопов могут иногда подражать пептиды, аминокислотная последовательность которых отличается от последовательности белковой молекулы, содержащей эпитоп, однако антитела, направленные против конформационных эпитопов, связывают и эти пептиды. Чтобы описать эти пептиды был введен термин “мимотоп” [Geysen et al., 1986].

Важно отметить, что среди вирусных эпитопов выделяют эпитопы, распознаваемые антителами, которые способны нейтрализовать вирусную инфекционность [Van Regenmortel, 2009]. Такие эпитопы называют нейтрализующими эпитопами. Эффективность нейтрализации зависит от свойств вируса, антител и зараженных клеток. Во многих случаях связывание антител с вирусной частицей приводит к подавлению способности вируса прикрепляться к определенным рецепторам на поверхности клетки-хозяина и, таким образом, ингибирует вирусную активность. Однако антитела, предотвращающие заражение вирусом одного типа клеток, могут быть не эффективны в случае другого типа [Mahy и van Regenmortel, 2009; Schutkowski и Reineke, 2009].

Ряд пептидов способен индуцировать продукцию антител, которые узнают нативные белки [Berzofsky и Berkower, 2003]. Учитывая свойства белковых структур, большинство эпитопов в нативных белках, вероятно, "конформационные" [Barlow et al., 1986] и, следовательно, большинство антител в поликлональных антисыворотках, направленных против этих белков, не узнают короткие пептиды [Van Regenmortel, 1989]. В целом, в нативных белках наиболее часто встречаются конформационные эпитопы. В денатурированных белках можно обнаружить лишь линейные. В условиях, способствующих закреплению антитела, эпитопы редко полностью разворачиваются, поскольку условия, в которых антигены развернуты (крайние значения pH, хаотропные агенты, ионные детергенты, и т.д.), также негативно влияют на иммуноглобулины и взаимодействия антиген-антитело [Van Regenmortel, 2009].

Помимо В-клеточных и Т-клеточных эпитопов белковые молекулы имеют функциональные домены – участки на поверхности белка, отвечающие за связывание с другими молекулами, включая белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты.

1.2.2. Способы картирования эпитопов

Традиционно эпитопное картирование проводится с помощью физико-химических методов: 1) фрагментирование очищенного антигена протеазами с последующим определением взаимодействующих фрагментов с помощью секвенирования [Atassi et al., 1968]; 2) химическое расщепление белков по определенным аскам [Atassi et al., 1970]; 3) химическая модификация определенных аскам [Atassi et al., 1971]; 4) генно-инженерный метод, который заключается в получении перекрывающихся пептидов, соответствующих первичной структуре АГ; 5) применение физических методов, таких как ЯМР и рентгеноструктурный анализ [Morris, 1996; Schutkowski и Reineke, 2009].

Еще один метод эпитопного картирования – рентгенокристаллография. Рентгенокристаллография часто расценивается как единственный метод для точного определения эпитопа с идентификацией всех аминокислот, контактирующих с антителом. Однако этот метод ограничен необходимостью получения хороших кристаллов комплексов антиген-антитело, и обычно применяется к конформационным эпитопам на поверхности растворимых белков. Методы ядерного магнитного резонанса (NMR) не нуждаются в кристаллах, но ограничены размером антигена, который может быть изучен и обычно применяются к пептидным антигенам [Morris, 1996; Schutkowski и Reineke, 2009].

Все методы эпитопного картирования являются трудоемкими, требуют значительного количества и высокой степени очистки исследуемого материала. Порой часть белковой последовательности не может быть проанализирована рентгенографически из-за разупорядоченности в кристалле [Singh et al., 2016]. В связи с этим, в настоящее время для относительно быстрой локализации эпитопов на поверхности антигена используется фаговый дисплей.

1.2.3. Эпитопное картирование ортопоксвирусных белков

С мембраной IMV вириона ортопоксвирусов ассоциировано более 20 белков, но мало что известно об их организации. Четыре белка из них, а именно A27L [Demkowicz et al., 1992; Lai et al., 1991], D8L [Sakhatskyu et al., 2006], H3L [Davies et al., 2005b] и L1R [Fogg et al., 2004], вызывают продукцию нейтрализующих антител и обеспечивают определенную защиту после активной или пассивной иммунизации.

Белок p14, кодируемый ОРТ А27L (110 ака) и локализованный в оболочке внутриклеточного зрелого вируса, вовлечен в процессы присоединения вируса к клетке, их слияния и выхода вирусных частиц из зараженной клетки. Известно, что этот белок связывает поверхностный гликозаминогликан – гепаран сульфат (ГС) [Vázquez и Esteban, 1999]. Для определения функционального домена, отвечающего за связывание с отрицательно заряженной молекулой ГС, проанализировали аминокислотную последовательность белка p14 и обнаружили, что участок из 12 ака (с 21 по 32) (STKAAKKPEAKR) богат лизином и аргинином и идеально подходит для ионных взаимодействий. Рекомбинантный белок А27L, содержащий в своем составе аминокислоты с 21 по 84 и связывающийся с клетками, включал в себя этот положительно заряженный участок [Chung, et al., 1998]. Участок с 1 по 20 ака соответствует сигнальному пептиду, и в зрелых вирусных частицах белок начинается с 21 ака [Takahashi et al., 1994]. Был создан мутантный белок D-A27L, содержащий в своем составе аминокислоты с 33 по 84. Для определения участка связывания белка p14 с гепаран сульфатом сконструировали рекомбинантный А27L и D-A27L, с помощью которого подтвердили, что предсказанный участок из 12 аминокислот (с 21 по 32) действительно отвечает за связывание белка с гепаран сульфатом [Chung, et al., 1998].

У ортопоксвирусов белковый комплекс слияния и проникновения вируса в клетку (entry/fusion complex (EFC)) состоит из по меньшей мере восьми трансмембранных белков, кодируемых ОРТ А16L, А21L, А28L, G3L, G9R, H2R, J5L и L5R [Satheshkumar и Moss, 2009]. При этом о физической структуре комплекса и иммуногенности отдельных его компонентов известно мало [Senkevich et al., 2005]. Для определения функциональных эпитопов двух компонентов EFC, кодируемых ОРТ А28L (146 ака) и H2R (189 ака) (ассоциированы с IMV), вызывающих продукцию нейтрализующих и протективных антител, были получены белки в растворимой форме [Nelson et al., 2008]. Нарботанными в бакуловирусах белками иммунизировали кроликов. Только антитела, направленные к рекомбинантному А28L, были способны связывать интактные вирионы и нейтрализовать вирусную инфекционность. Для картирования эпитопа белка, кодируемого ОРТ А28L, методом пептидного сканирования использовали набор перекрывающихся пептидов длиной 20 ака, с перекрыванием в 11 остатков, и нейтрализующие антитела. В результате

было показано, что нейтрализующий эпитоп расположен в области 73 – 92 аао белка, кодируемого ОРТ А28L. [Nelson et al., 2008]

Для двух из трех белков EEV, кодируемых ОРТ А33R (185 аао) и В5R (317 аао), индуцирующих образование вируснейтрализующих антител, была определена структурная организация функциональных эпитопов. Методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) было показано, что три МАbs узнают один и тот же или близко расположенные эпитопы белка А33L [Chen et al., 2007]. Два растворимых пептида А33L, deletированные с N-конца (89-185 и 99-185), были экспрессированы в бактериях, и методом ИФА было показано специфичное связывание МАbs с этими пептидами. В вестерн-блот анализе оба пептида не выявлялись анти-А33 МАbs, что позволило предположить, что эпитоп, узнаваемый нейтрализующими антителами является конформационным. При дальнейшем deletировании аао с N- или С- концов белка А33L (пептиды 89-179, 101-185, или 110-185) пептиды перестали экспрессироваться в *E.coli*, и точная локализация нейтрализующего эпитопа А33L не установлена. Таким образом, эпитоп, узнаваемый анти-А33L антителами, может быть конформационным и находится в области 99 – 185 аао на С-конце белка. [Chen et al., 2007].

В5R (317 аао), один из нескольких EEV-специфических белков молекулярной массой 42-кДа, высоко консервативен среди ортопоксвирусов. Эктодомен состоит из четырех областей со схожими короткими консенсусными повторами (SCR), а также “stalk”-последовательности из 51 аминокислоты, находящейся рядом с трансмембранным доменом [Engelstad et al., 1992]. Было показано, что поликлональные антитела, специфичные к эктодомену белка В5R, ингибирует EEV вирусную инфекцию [Aldaz-Carroll et al., 2005a]. Для картирования эпитопа с помощью бакуловирусной системы экспрессии получили растворимый белок В5R (275t) и исследовали панель из 26 моноклональных антител, которые связывали В5R (275t). Пять из этих МАbs нейтрализовали EEV и подавляли образование кометообразных бляшек. Два других МАbs только нейтрализовали EEV, а пять других только ингибировали образование кометообразных бляшек. Это свидетельствует о том, что за нейтрализацию EEV и ингибирование образования кометообразных бляшек отвечают, по крайней мере, два различных эпитопа В5R. Поскольку все моноклональные антитела выявляли белок В5R (275t) в вестерн-блот

анализе, авторы предположили, что оба функциональных эпитопа являются линейными. Картирование эпитопов проводили с помощью ИФА с использованием набора из 28 перекрывающихся пептидов, соответствующих эктодомену белка B5R. Восемнадцать из 26 MAbs связывали, по крайней мере, один пептид, и они соответствовали обоим концам эктодомена B5R (275t). MAbs, нейтрализующие инфекционность EЕV взаимодействовали с N-концевыми пептидами, а среди MAbs, ингибирующих образование кометообразных бляшек, было выделено 4 группы. Антитела первой группы взаимодействовали с пептидами соответствующими “stalk”-последовательности, антитела второй группы – с пептидами SCR1-SCR2 границы, антитела третьей группы выявляли пептиды, соответствующие обоим концам эктодомена B5R (275t), последняя группа антител не связывала ни один из пептидов [Aldaz-Carroll et al., 2005].

1.2.4. Создание вакцин на основе эпитопов

Взаимодействие между антителом и соответствующим антигеном лежит в основе гуморального ответа. Иммуная активность антитела направлена против конкретного эпитопа [Goldsby et al., 2002]. Идентификация эпитопа имеет важное медицинское значение в таких применениях, как разработка вакцин. Вакцинация только эпитопом, а не целым микроорганизмом или выделенным антигеном, может быть намного безопаснее и эффективнее [De Groot, 2004]. Эпитопное картирование может дополнительно применяться в области диагностики заболеваний и иммуоинтервенции [Westwood и Hay, 2001]. Кроме того, характеристика эпитопов важна в контексте разработки лекарств [Irving et al., 2001].

Антитела – эффективный способ защиты при профилактике инфекционных заболеваний. Очень мощные нейтрализующие антитела могут «перехватить» вирус до того, как он свяжется с клеткой-мишенью, и инактивировать его. Эта способность основана на специфичном узнавании эпитопов антителами. При обычном прививании в качестве вакцины используют аттенуированный или убитый инактивированный патоген. С появлением рекомбинантных технологий ДНК, возникло новое направление в вакцинации, в котором изолированные антигены заменяют интактные патогены для прививки. Это предоставляет возможность сфокусировать иммунный ответ на более значимых мишенях. Предполагается, что

иммунизация определенным рекомбинантным белком, представляющим собой конкретный эпитоп, являющийся АГ для эффективного нейтрализующего антитела, могла бы индуцировать наработку таких же мощных антител как при классической вакцинации.

Действительно, вакцины, основанные на изолированных антигенах, называемые субъединичными вакцинами, стали очень эффективными, и их использование все более расширяется. Создание такой «вакцины, основанной на В-клеточном эпитопе» требует возможности возвращаться от желаемого АГ к соответствующему ему эпитопу. Таким образом, изучение взаимодействия АГ/эпитоп дает основу для рационального конструирования профилактических вакцин. Хотя использование основанных на эпитопе вакцин еще не осуществлено коммерчески, оно должно оказаться эффективным и в некоторых случаях устранить проблемы, существующие для традиционных вакцин. Во-первых, иммуннодоминантные эпитопы не обязательно соответствуют самым эффективным нейтрализующим АГ. Патоген получает преимущество, когда способен скрыть свои «слабые места» и отвлечь иммунную систему хозяина, создав «привлекательные» эпитопы с небольшой протективностью. Это может быть достигнуто созданием своего рода «приманок», которые доступны, т. к. расположены на поверхности, и гидрофильны, но поддаются постоянному генетическому изменению. Например, пять переменных петель высокоиммуногенного белка ВИЧ-1 gp120. Постоянно изменяющаяся структура петель, позволяет вирусу уходить от иммунного контроля, избегая связывания с антителами, индуцированными после первого появления вируса [Kwong et al., 1998; Parren et al., 1999; Wyatt et al., 1998a; Wyatt и Sodroski, 1998b].

При создании вакцин следует отбирать эпитопы, способные индуцировать наработку мощных вируснейтрализующих антител. Такие эпитопы, наиболее вероятно, соответствуют консервативным белкам патогена, которые чаще всего малоиммуногенны. Во-вторых, нарабатываемые против патогена антитела могут быть опасны из-за возможности эпитопа мимикрировать под белки хозяина. В случае чужеродного антигена, имеющего структурные сходства с родными белками хозяина, связывание антител с такими сходными структурами может привести к перекрестному взаимодействию антител с аутоантигенами, что вызовет

патологический аутоиммунитет [Albert и Inman, 1999; Bogdanos et al., 2001]. В этом случае, желаемый эффект иммунитета уступает кросс-реактивности. Очевидно, при разработке эпитопных вакцин можно рационально конструировать «эпитопный коктейль», чтобы исключить эпитопы, которые могли быть связаны с аутоантигенами.

Первый шаг при разработке эпитопной вакцины – идентификация эпитопа с достаточной точностью и исследование связывания с ним антител различными методами (вестерн-блот анализ, дот блот, ELISA). Как только эпитопы идентифицированы, следующий шаг – их воссоздание для получения эффективных иммуногенов. После создания эпитопа, точной копии или просто подобного по структуре (миметика), третий шаг в развитии эпитопной вакцины – производство эффективных иммуногенов. Для этого, эпитопы необходимо установить на носитель и затем разрабатывать наиболее эффективные схемы иммунизации, учитывая способы иммунизации, адъюванты и программы иммунизации [Andersen, 1994; Babai et al., 1999; Nemchinov et al., 2000].

Решенные трехмерные (3D) структуры комплексов антитело-антиген обеспечивают хорошую отправную точку для детальной функциональной характеристики эпитопов, поскольку они позволяют обнаруживать конкретные взаимодействующие участки. К сожалению, решенная трехмерная структура недоступна для подавляющего большинства взаимодействующих пар антитело-антиген. Поэтому для характеристики эпитопов прибегают к альтернативным подходам, например к фаговому пептидному дисплею [Mayrose et al., 2007].

1.3. Фаговый дисплей

1.3.1. Основные принципы фагового дисплея

Фаговый дисплей - это молекулярный метод, при котором ДНК фага генетически модифицируется для экспрессии на поверхности фага пептида или белка, слитого с одним из белков оболочки фага. Эта стратегия принципиально отличается от других бактериальных систем экспрессии тем, что экспонированные пептиды или белки и кодирующая их ДНК физически связаны. Эта физическая связь позволяет проводить скрининг большого количества фаговых клонов в жидкой фазе, отбирать клоны с высокой аффинностью, а затем идентифицировать кодирующие их

последовательности посредством секвенирования ДНК. Стратегия фагового дисплея была впервые описана Джорджем Смитом в 1985 году [Smith, 1985]. С тех пор с помощью этой технологии было создано много фаговых библиотек как для биотехнологических, так и для медицинских применений [Barbas et al., 1991; Kennedy et al., 2018; Nixon et al., 2014; Smith и Petrenko, 1997]. Фаговая библиотека пептидов или белков представляет собой популяцию бактериофагов, каждый из которых экспонирует на своей поверхности в составе химерного белка уникальный пептид или белок. Несмотря на наличие других методов *in vitro*, таких как дрожжевой дисплей [Cherf Cochran, 2015], рибосомный дисплей [Yan и Xu, 2006] или мРНК-дисплей [Ohashi et al., 2013], фаговый дисплей является наиболее часто используемым методом для отбора пептидов и антител человека. Фаговый дисплей открыл совершенно новую сферу возможностей в обнаружении и разработке антител. Используя эту технологию, моноклональные антитела человека в настоящее время получают без иммунизации животных [Frenzel et al., 2016; Kennedy et al., 2018]. В 2018 году Джорджу Смигу и Грегори Винтеру была присуждена Нобелевская премия по химии за разработку технологии фагового дисплея пептидов и антител.

Для фагового дисплея чаще всего используют бактериофаг M13 и нитевидные фаги fd; кроме того, используют фаги T4 и T7 [Smith и Petrenko, 1997]. Фаг M13 обладает высокой способностью к репликации, в его геном методами генетической инженерии можно встраивать большие чужеродные фрагменты ДНК, эти свойства делают его наиболее используемым вектором для фагового дисплея. M13 – нелитический фаг, состоящий из ограниченного числа структурных белков, собранных вокруг одноцепочечной кольцевой геномной ДНК, кодирующей белки фага (Рисунок 3). Инфицирование бактерии-хозяина происходит путем прикрепления фагового белка рIII к F'-пилю *E. coli*. Одноцепочечная ДНК проникает в бактерии, где она при помощи ферментов репликации *E. coli* превращается в двуцепочечную плазмидоподобную репликативную форму (RF-молекулу). Такая молекула служит матрицей для транскрипции и трансляции фаговых белков. Сборка бактериофага происходит внутри или вблизи внутренней мембраны бактерий-хозяев и в периплазме [Straus и Vo, 2018].

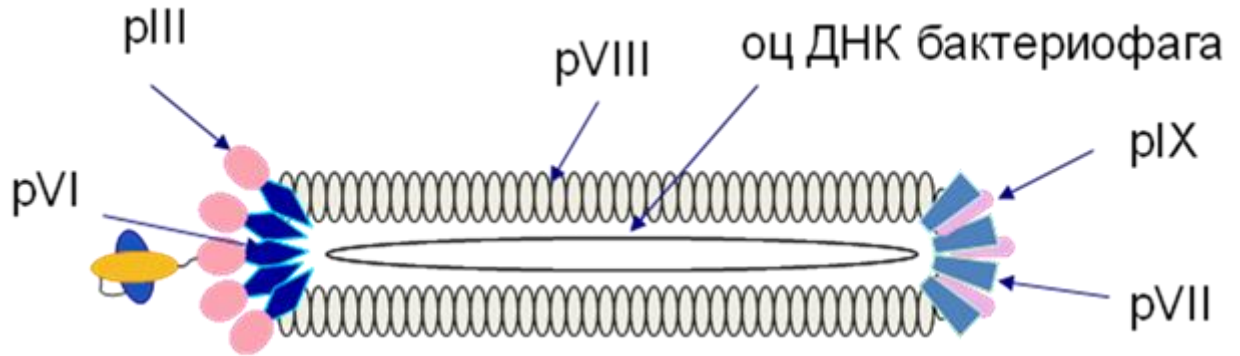


Рисунок 3 – Структура фага M13 с одноцепочечным антителом [Tikunova et al., 2009]

Каждая частица фага M13 имеет 3-5 копий белка pIII, в отличие от наиболее распространенного белка оболочки pVIII, которого около 2700 копий. Эти два белка оболочки чаще всего используют для экспрессии пептидов. Такие векторные системы обозначаются как 3 и 8 системы соответственно [Kay et al., 1996]. Фрагменты белков, обладающие большими размерами, в том числе фрагменты антител, обычно сливаются с N-концом белка pIII.

Обычно используют два основных типа фаговых векторов [Enshell-Seijffers et al., 2001; Hoogenboom et al., 1991; Qi et al., 2012]: система с одним геном, при которой модифицированы все копии одного белка оболочки, и система с двумя генами, при которой геном фага несет как дикий тип, так и рекомбинантный вариант белка оболочки. В системе с одним геном пептид или белок экспонирован в многовалентном формате, и все копии белка оболочки представлены в виде слитых белков.

Для небольших пептидов принято использовать систему с pVIII белком. Для более крупных полипептидов используют систему с белком pIII, поскольку такие полипептиды влияют на функцию белка pVIII. Однако некоторые слитые полипептиды могут мешать взаимодействию между pIII и F-пилем, и таким образом отрицательно влиять как на вирулентность фага, так и на разнообразие библиотек [Straus и Во, 2018]. В системах с двумя генами используют либо тандемный повтор гена, кодирующего белок оболочки в геноме фага, в котором модифицирована одна из копий, либо систему с использованием фагмиды.

Фагмиды – векторные молекулы, сочетающие свойства плазмиды и фага [Kay et al., 1996]. Относительно небольшой размер фагмид позволяет клонировать в них

более крупные фрагменты генов, кодирующие слитые белки. Эффективность трансформации фагами выше, чем фаговыми векторами, что позволяет конструировать библиотеки пептидов или белков с большим репертуаром (представительностью) [Qi et al., 2012]. Кроме того, при многократной амплификации фагмиды генетически более стабильны, чем рекомбинантные фаги. В отличие от фагового вектора, который содержит все гены, кодирующие белки оболочки фага, фагмидный вектор содержит только ген, кодирующий слитый белок рIII, и ген устойчивости к антибиотику. Таким образом, ко-инфекция фагом-помощником в фагмидной системе необходима для экспрессии белков, необходимых для сборки нативных фаговых частиц. Обычно в качестве фага-помощника используют фаг M13K07 или VCSM13 [Hoogenboom et al., 1991]. При использовании таких систем большинство копий новых фаговых частиц происходит от фагов-помощников, что приводит к моновалентному экспонированию полипептидов на их поверхности. В целом, использование фагмидов лучше всего подходит при фаговом дисплее антител, таких как scFv и Fab-фрагменты, а также при экспонировании пептидов с низкой валентностью [Qi et al., 2012].

Включение amber стоп-кодона (TAG) между целевым белком и белком оболочки фага позволяет экспрессию слитого белка в супрессорных штаммах *E.coli*, таких как TG1; при этом кодон TAG будет транслироваться как остаток глутамина. Однако в не супрессорных штаммах, таких как HB2151, будет продуцироваться растворимая форма рекомбинантного белка, поскольку в таких штаммах не будут включать глутамин в амбер стоп-кодоне, кодон TAG будет обычным стоп-кодом [Hoogenboom et al., 1991].

Литический бактериофаг T7, который лизирует своего бактериального хозяина, также использовался для конструирования пептидных библиотек [Krumpe et al., 2006; Matsumoto et al., 2011]. В фаговой системе T7 пептидные последовательности обычно объединяют с С-концом капсидного белка 10В. В библиотеках T7 систематическая ошибка наблюдается реже, чем в библиотеках нитчатых фагов, поэтому такие библиотеки чаще всего используются для исследования более длинных пептидов (12–20 аа), связывающихся с клетками [Krumpe et al., 2006]. Короткие пептидные библиотеки (7–12 аа) более популярны при фаговом отображении M13.

1.3.2. Основные методические этапы фагового дисплея

Библиотеки, как пептидов, так и антител обычно подвергают обогащению с помощью повторных циклов отбора против интересующей мишени. Такой процесс скрининга называется биопэннингом. Вкратце, метод аффинного отбора основан на повторяющихся циклах инкубации, отмывки, элюции связанных фагов, амплификации фагов и повторного отбора амплифицированных фагов в клетках *E.coli*. Мишенью может быть иммобилизованный белок или целая клетка. В случае живых клеток, процесс скрининга обычно осуществляется путем инкубации библиотеки фагов с клетками-мишенями, и после отмывания несвязанных фагов, связанные с мишенью фаги, элюируются и амплифицируются в бактериях. Процесс селекции и амплификации обычно повторяют 3-5 раз, чтобы обеспечить обогащение высокоспецифичных фагов. Отбор может быть выполнен с прикрепленными, неприкрепленными клетками или *in vivo*. При использовании сложных мишеней, таких как клетки млекопитающих, обычно требуется усиление специфического связывания выше фонового связывания с фагом, поскольку ожидается, что неспецифическое связывание с обычными мембранными рецепторами повлияет на качество отобранных фагов. Чтобы обойти эту проблему, можно предварительно истощить фаговую библиотеку на нецелевых родственных клетках, и тем самым уменьшить количество фагов, которые связываются с общими рецепторами. Каждый шаг биопэннинга также должен быть оптимизирован для типа используемых клеток. В случаях, когда лиганды для исследуемых мишеней известны, возможно использование конкурентного элюирования [McCafferty et al., 1990; Sioud et al., 2019].

В дополнение к *in vitro* отбору, несколько групп исследователей успешно идентифицировали целевые лиганды с помощью биопэннинга *in vivo* [Deramchia, K., 2012; Teesalu, T., 2012]. Вкратце, после введения библиотеки пептидов или антител животному интересующие ткани собирают, промывают, затем элюированные фаги амплифицируют в клетках *E.coli* и используют в последующих циклах инъекции и отбора [Teesalu et al., 2012]. Пептиды, отобранные с использованием *in vivo* биопэннинга, могут оказаться клинически более значимыми, учитывая, что они отобраны в определенной модели заболевания. Тем не менее, большинство животных моделей не точно имитируют состояние человека.

1.3.3. Фаговые библиотеки антител

Библиотеки фаговых антител конструируют путем клонирования репертуаров генов, кодирующих переменные домены тяжелых (VH) и легких (VL) цепей антител, путем случайного слияния в фаговой или фагмидной векторной системе и экспонирования на поверхности бактериофага [McCafferty et al., 1990]. Таким образом, метод имитирует сборку и наработку антител В-клетками. Каждая В-клетка представляет собой самореплицирующуюся систему, содержащую гены, которые кодируют антитело, экспонированное на ее поверхности. В ходе естественного развития В-клеток функциональные гены иммуноглобулина (Ig) собираются случайным образом из генных сегментов переменных доменов тяжелых и легких цепей, что приводит к образованию наивного репертуара, способного реагировать с неограниченным количеством чужеродных антигенов [Alt et al., 1984]. В течение периода активации антигенами каждая В-клетка подвергается процессу, называемому соматической гипермутацией, при которой ако, особенно в областях, определяющих комплементарность (CDR, complementarity determining region), мутируют [Tonegawa, 1983]. Этот этап соматической гипермутации играет существенную роль в увеличении, как сродства, так и селективности антител к их антигенам-мишеням. В фаговом дисплее этот шаг *in vivo* можно имитировать с помощью таких стратегий, как сайт-направленный мутагенез и перетасовка тяжелых / легких цепей [McCafferty et al., 1990]. После аффинного созревания В-клетки, экспрессирующие антитела с высокой аффинностью к антигену-мишени, клонально размножаются с образованием В-клеток памяти и плазматических клеток, секретирующих антитела. Следует отметить, что репертуар иммуноглобулинов является селективируемым, поскольку в каждой В-клетке генотип и фенотип связаны, как в библиотеках фаговых антител [Деев и Лебеденко, 2009].

Интерес к использованию антител в клинических условиях появился с начала девятнадцатого века. Разработка специфических антител первоначально ограничивалась только поликлональными антителами, что требовало большого количества животных, иммунизированных целевым антигеном. В 1975 году была разработана гибридная технология для получения моноклональных антител (mAbs) [Köhler и Milstein, 1975]. Этот метод основан на слиянии клеток селезенки (В-клеток, секретирующих антитела) от иммунизированного животного с клетками

миеломы мыши, что приводит к образованию гибридных клеток (гибридом), которые можно поддерживать в культуре клеток для секретирования специфических mAb. Эта технология дала начало разработке терапевтических моноклональных антител, и в 1985 году FDA одобрило первое терапевтическое mAb, Muromonab-anti-CD3. Однако иммуногенность полученных из мышей mAb исключает их применение при хронических или рецидивирующих заболеваниях человека. Мышиные mAbs часто распознаются иммунной системой пациентов как чужеродные, что приводит к развитию иммунного ответа человека против антител мыши (human anti-mouse antibody – НАМА-ответу) [Tjandra et al., 1990]. Путем замены мышиных последовательностей гомологичными последовательностями человека в генах, кодирующих константные домены антитела, так называемой гуманизации антител возможно частично обходить НАМА-ответ [He et al., 1998].

Принимая во внимание проблемы, упомянутые выше, возможности пептидных фаговых библиотек и сборку генов иммуноглобулинов в В-клетках, Винтер и его коллеги показали, что большие библиотеки комбинаторных антител, созданные случайной комбинацией генов переменных доменов тяжелой и легкой цепей, также можно экспонировать на поверхности нитевидного фага M13 [Marks et al., 1991; McCafferty et al., 1990]. Достижения в технологии рекомбинантных ДНК, благодаря внедрению метода ПЦР, позволили быстро выделить и клонировать различные домены антител и создать библиотеки антител. Используя наборы праймеров, специфичных для различных семейств генов VH и VL, был амплифицирован весь репертуар генов VH и VL. Затем этот репертуар генов случайным образом объединяли, для создания библиотек одноцепочечных переменных (scFv) или Fab-фрагментов антител, экспонированных на поверхности фагов, тем самым обеспечивая быстрый отбор аффинных антител из больших библиотек [Hammers и Stanley, 2014; Lerner, 2016; Marks et al., 1991; Unkauf et al., 2016; Winter et al., 1994].

1.3.4. Типы фаговых библиотек антител

Сегменты генов антител могут быть получены либо из нормальных В-клеток, либо синтетическими методами, соответственно сконструированные библиотеки будут «натуральными» и «синтетическими». Натуральные библиотеки антител делятся на «иммунные» (immune) и «наивные» (naïve), поскольку V-гены могут быть

получены от иммунизированных или неиммунизированных доноров [Батанова и др., 2006; Frenzel et al., 2016; Tikunova и Morozova, 2009].

Первая наивная фаговая библиотека антител была создана путем амплификации последовательностей переменных доменов из лимфоцитов периферической крови неиммунизированных доноров [McCafferty et al., 1990]. Такие библиотеки от неиммунизированных доноров позволяют выделять антитела против широкого спектра антигенов, включая неиммуногенные и токсичные антигены [Unkauf et al., 2016]. Основным недостатком этих библиотек является то, что отобранные антитела часто имеют низкую аффинность по сравнению с антителами при первичном иммунном ответе. Однако, как только антитело с желаемой специфичностью было идентифицировано, его аффинность и кинетика связывания могут быть улучшены посредством мутагенеза, который часто осуществляется путем введения случайных или специфических мутаций в области CDR3 или обмена легкими цепями путем перетасовки цепей [Ho et al., 2005; Hoogenboom, 2005; Wu et al., 1998]. Перестановка легких цепей объединяет тяжелые цепи выбранного антитела со всем репертуаром легких цепей наивной библиотеки.

Фаговые библиотеки антител также могут быть сконструированы из иммунизированных пациентов или животных [Beerli и Rader, 2010; Graus et al., 1997; Ohlin и Vorrebaeck, 1996]. Использование иммунных библиотек может привести к отбору терапевтических антител с высоким сродством, сравнимым с антителами, продуцируемыми при вторичных иммунных ответах. Таких высокоаффинные антитела могут быть отобраны даже из иммунных библиотек с относительно небольшим разнообразием [Beerli и Rader, 2010]. Библиотеки иммунных антител были сконструированы из реорганизованного репертуара V-генов пациентов с различными инфекциями (вирусами, паразитами, бактериями) и аутоиммунными заболеваниями [Дубровская и др., 2007; Дубровская и Тикунова, 2007; Graus et al., 1997; Hamidon et al., 2018; Ohlin и Vorrebaeck, 1996; Rahumatullah et al., 2015; Scott et al., 2013]. Такие библиотеки антител можно использовать для отбора антител против нескольких антигенов одного и того же заболевания.

В отличие от натуральных библиотек, в синтетических библиотеках антител разнообразие в V-генных сегментах создано искусственно. Рандомизированные CDR регионы обычно встраивают в синтетические каркасные последовательности VH и

VL. Эти библиотеки позволяют выделить высокоаффинные антитела против любого антигена, включая неиммуногенные, токсичные и аутоантигены. Библиотека NuCal была первой созданной синтетической библиотекой, состоящей из 10^{10} полностью человеческих Fab-фрагментов, из которой получили антитела с наномолярным (нМ) сродством к ряду антигенов [Knappik, A., 2000]. Разнообразие каркасных областей ограничено семью консенсусными последовательностями тяжелых и семью последовательностями легких цепей. Совсем недавно была создана большая полностью синтетическая библиотека Fab-фрагментов антител человека (названная Ylanthia) с использованием 36 фиксированных каркасных пар VH / VL, с разнообразием 10^{11} уникальных клонов [Tiller et al., 2013].

Кроме того, существуют полусинтетические библиотеки, это наивные библиотеки, в которых CDR3 тяжелых цепей заменены случайными последовательностями [Barbas et al., 1992]. Введение разнообразия в гипервариабельные регионы V-генных сегментов зародышевых линий заменяет этап иммунизации [Benhar, 2007]. Генерирование антител против собственных или токсических антигенов ограничено при использовании иммунизации. В частности, аутоантигены млекопитающих высоко консервативны, и поэтому невозможно получить иммунный ответ при иммунизации наиболее часто используемых лабораторных животных, таких как мыши или крысы.

1.3.5. Пептидный дисплей

Фаговый дисплей библиотек случайных пептидов [Cwirla et al., 1990; Devlin et al., 1990; Scott и Smith, 1990] является мощным инструментом для идентификации и характеристики пептидов, имитирующих участки связывания с конкретными селекторными молекулами, такими как антитела [Cortese et al., 1996; Scott и Craig, 1994; Wang и Yu, 2004]. Эта технология основана на многообразии случайных последовательностей пептидов, экспонированных на поверхности нитчатых бактериофагов и способных взаимодействовать с антителами. При исследовании взаимодействия антитела и антигена, проводят скриннинг библиотеки случайных пептидов по способности отдельных пептидов связывать антитело. Предполагается, что отобранные пептиды имитируют эпитоп с точки зрения физико-химических свойств и пространственной организации. Таким образом, алгоритмическая задача

состоит в том, чтобы правильно спрогнозировать соответствующий эпитоп на поверхности антигена. Библиотеки случайных пептидов имеют потенциальное преимущество, которое позволяет выявить критические участки в эпитопах [Du Plessis et al., 1994] и обнаружить мимотопы, которые могут имитировать прерывистые эпитопы [Geysen et al., 1986]. Такая работа была успешно проделана для гена *gag* вируса иммунодефицита человека [Tsunetsugu-Yokota et al., 1991], для капсидного белка VP5 вируса синего языка [Wang и Yu, 1995], для гликопротеина E2 вируса гепатита С [Naik et al., 2017], а также для HBs антигена вируса гепатита В [Bahadir et al., 2011].

При картировании эпитопов с использованием моноклональных антител следует учитывать, что антитела часто кроссреактивны, то есть связываются с последовательностями или структурами не только истинного антигена. Однако следует отметить, что при составлении карты не всегда известна степень зависимости конформации антигена и эффективности связывания антитела. Незначительно различающиеся антитела узнают одну и ту же область белка, но с различной аффинностью или различной толерантностью к аминокислотным заменам.

Моноклональные антитела, которые связывают белки в вестерн-блот анализе, обычно направлены против линейных эпитопов, тогда как MAbs, которые узнают антигены в жидких фазах при иммунологических исследованиях или в замороженных тканях, часто направлены против конформационных эпитопов. Однако у некоторых белков, идентифицированных методом вестерн-блот анализа, может быть значительный конформационный участок. Помимо моноклональных антител при картировании эпитопов могут быть применены поликлональные антисыворотки, которые должны быть расценены как смесь MAbs. В отличие от MAbs, антисыворотки обычно узнают и нативные, и денатурированные белки; таким образом, антитела в антисыворотке, которые используются, чтобы продемонстрировать его специфичность вестерн-блоттингом, могут отличаться от антител, которые являются активными в иммунологическом обследовании антисыворотки [Morris, 1996].

В том случае, когда панель пептидов имеет общий мотив, который хорошо соответствует линейной последовательности внутри антигена, картирование эпитопа

становится самоочевидным. В таком случае эпитоп может быть определен с помощью стандартных подходов выравнивания последовательностей [Burrill et al., 1995]. Однако, отобранные пептиды зачастую не имеют очевидного сходства с каким-либо линейным фрагментом антигена. Это отражает тот факт, что взаимодействия антитело-антиген опосредуются через их третичные структуры и, следовательно, эпитоп часто состоит из прерывистых участков и является конформационным. В таком случае, основная вычислительная задача состоит в том, чтобы правильно соотнести пептиды с трехмерной структурой, которой они должны соответствовать.

Существует ручной алгоритм картирования эпитопов с использованием пептидов, отобранных с помощью фагового дисплея. В этом подходе поверхность антигена представлена «поверхностным ансамблем» коротких пептидов. Мотивы коротких последовательностей, полученные из таких пептидов, ищутся по этому ансамблю. После ручной калибровки получается предсказанный эпитоп. Кроме того существуют и автоматизированные методы, в которых пептиды выравнивают с антигеном, используя различные алгоритмы [Enshell-Seiffers et al., 2003; Halperin et al., 2003; Moreau et al., 2006; Schreiber et al., 2005]. По сути, целью всех этих методов является выравнивание набора линейных последовательностей на трехмерной структуре антигена. Однако у всех методов есть ограничения и недостатки. Алгоритм SiteLight [Halperin et al., 2003] не учитывает порядок последовательности пептидов. Алгоритм Enshell-Seiffers [Enshell-Seiffers et al., 2003] разделяет пептиды на пары аминокислот и картирует встречающиеся пары на поверхности антигена. Метод 3DEX [Schreiber et al., 2005] ищет идеальные совпадения; но не учитывает пробелы. Алгоритм MIMOP [Moreau et al., 2006] сначала выравнивает пептиды с антигеном на уровне последовательности и только затем включает информацию из трехмерной структуры.

Заключение

В настоящее время ортопоксвирусы продолжают оставаться источником биологической опасности для людей: до сих пор существуют зоонозные инфекции, поражающие человека, вызываемые вирусами оспы обезьян, оспы коров и осповакциноподобными вирусами. Причем вирус оспы обезьян может

обуславливать вспышки оспоподобного заболевания человека, в регионах, далеко отстоящих от Африки, где находятся очаги этого вируса, и смертность при таком заболевании может достигать 15 %. Однако в связи с ликвидацией вируса натуральной оспы массовая вакцинация была прекращена во второй половине 70-х годов прошлого века, и в настоящее время большинство населения иммунитета к ортопоксвирусным инфекциям не имеет.

Вакцинация осповакциной способствует продукции эффективных вируснейтрализующих антител, не вызывая стереотипный ответ на один ключевой антиген, а вместо этого стимулируя наработку вируснейтрализующих антител к множеству вирусных белков. Вирион поксвируса содержит более 75 структурных и функциональных белков. Более 20 белков ассоциировано с мембраной вириона ортопоксвируса, но об их организации мало что известно. Часть из них вызывают продукцию вируснейтрализующих антител лишь несколько из них, включая белок р35, кодируемый ОРТ НЗЛ, индуцирует образование протективных антител

Известно, что белок р35 является иммунодоминантным антигеном как для иммунизированных лабораторных животных, так и для вакцинированных вирусом осповакцины людей. Этот белок обладает способностью связываться с поверхностью клетки через гепаран сульфат и, таким образом, участвует в процессе проникновения вирусной частицы в клетку, кроме того он задействован в морфогенезе вируса. Недавно был выполнен рентгеноструктурный анализ белка р35 вируса осповакцины, но вместе с тем эпитопы, отвечающие за взаимодействие с вируснейтрализующими антителами, к настоящему времени не локализованы.

Существуют различные методы эпитопного картирования. Большинство из них, как правило, являются трудоемкими, требуют значительного количества и высокой степени очистки исследуемого материала, при этом зачастую некоторые фрагменты белковой последовательности не могут быть проанализированы по тем или иным причинам. В последние 25 лет бесценным инструментом для изучения белок-белковых взаимодействий является технология фагового дисплея, в том числе и для исследования взаимодействий антиген-антитело, а значит и эпитопного картирования. Однако, результаты эпитопного картирования, полученные методом фагового дисплея, требуют подтверждения с использованием других подходов. Вот почему в данной работе было запланировано получение вируснейтрализующих

антител против ортопоксвирусов и локализация вируснейтрализующего эпитопа (эпитопов) разными методами.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы

В работе использовали реактивы следующих фирм:

Агароза-GTG (Lonza, Швейцария); бактоагар (Difco, США); бактотриптон (BD, США); азид натрия; бычий сывороточный альбумин (БСА); глицерин; глицин; диметилсульфоксид (DMSO); дитиотреитол – ДТТ; ксиленцианол; нитро-тетразолиевый голубой (NBT); пунцовый С; Твин-20 – Tween-20; трис(гидроксиметил)аминометан - трис; (Amresco, США); бромистый этидий; бромфеноловый синий; Кумасси R-250; этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Serva, Германия); Sephadex G50 SuperFine (GE Healthcare, Великобритания); акриламид; N,N-метиленбисакриламид; 2-меркаптоэтанол; нитроцеллюлоза (Bio-Rad, США); 5-бromo-4-хлор-3-индолил-фосфат (BSIP); кристаллический фиолетовый (Roche, Франция); агароза; додецилсульфат натрия – SDS; 3-[N-морфолино]пропансульфоная кислота (MOPS); персульфат аммония; полиэтиленгликоль 6000 - ПЭГ; полный и неполный адъювант Фрейнда; триэтиламин; формаид (Sigma, США); глютамин (Биолот, Россия); дрожжевой экстракт; паранитрофенилфосфат – pNPP; N,N,N',N'-тетраметилэтиленамид - TEMED (Fluka, Швеция); дезоксинуклеотид-5'-трифосфаты - dNTP (Биосан, Россия); “BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit” (Applied Biosystems, США); GlutaMAX (Life Technologies, США); Lipofectamin 2000 (Invitrogen, США); X-gal (Carl Roth, Германия); белок А-сефароза CL-4B (Life Technologies, США)

Наборы «PureYield(TM) Plasmid Midiprep System» (Promega, США); «QIAquick Gel Extraction Kit» (QIAGEN, США); «Ni-NTA Spin Kit» (QIAGEN, США); «GeneJET Gel Extraction Kit» (Thermo Scientific™, США). Колонка Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, Великобритания)

Маркеры молекулярного веса ДНК 100bp и 1kb (СибЭнзим, Россия), *NotI*-гидролизат плазмиды pBR327. Маркеры молекулярной массы белков (Fermentas).

Поликлональные антитела кролика к бактериофагу M13 (любезно предоставлены Белановым Е.Ф., к.м.н., зав. лабораторией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Роспотребнадзора, Кольцово). Поликлональные антитела козы против IgG (H+L) мыши и антитела козы против IgG кролика, конъюгированные со щелочной фосфатазой (ICN, США). Поликлональные антитела козы против Fc-фрагмента IgG человека, и поликлональные антитела козы против цельной молекулы (H+L) IgG человека, конъюгированные со щелочной фосфатазой (Sigma, США).

Поликлональные антитела козы против IgG (H+L) человека, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 633; поликлональные антитела козы против IgG (H+L) мыши, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 633; DAPI (Life Technologies, США).

Антибиотики: ампициллина натриевая соль, канамицина сульфат, тетрациклина гидрохлорид (Gerbu, Германия); гигромицин Б, зеоцин (Life Technologies, США).

Все остальные использованные реактивы отечественного производства имели квалификацию не ниже «ОСЧ» и «ХЧ».

2.1.2. Эукариотические клетки и бактерии

Штаммы *Escherichia coli*:

- TG1 *suppressor strain* (K12, $\Delta(lac-proAB)$, *supE*, *thi*, *hsd* Δ 5, *F'*, *traD36*, *proA*⁺*B*⁺, *lacI*^q, *lacZ* Δ M15) (Baer R., 1984);
- DH5 α F' (*F'*, ϕ 80*dlacZ* Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(*r*_K⁻, *m*_K⁺), *supE44*, *relA1*, *deoR*, $\Delta(lacZYA-argF)$ U169).
- XL1Blue (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [*F'* *proAB lacIq* Δ M15 Tn10 (Tetr) «Stratagen»).
- ER2738 (*F'* *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q $\Delta(lacZ)$ M15 *zzf::Tn10*(Tet^R)/ *fhuA2 glnV* $\Delta(lac-proAB)$ *thi-1* $\Delta(hsdS-mcrB)$ 5) (New England Biolabs, США).

Эукариотические клетки *Vero* E6, CHO-K1 и CHO-S/FRT из «Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур» ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия).

Эукариотические клетки *Vero* 4647 из коллекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово, Россия).

Эукариотические клетки CHO-S (Life Technologies, США).

2.1.3. Вирусы и бактериофаги

Для исследования использовали ВНО, штамм Ind-3а; ВОВ, штамм Elstree, вариант Л-ИВП; ВОК, штамм GRI-90; ВОО, штамм Zaire; ВЭ, штамм К-1 из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Ортопоксвирусы культивировали на хорион аллантоисных оболочках растущих куриных эмбрионов и очищали центрифугированием в градиенте сахарозы. Кроме того, использовали ВОВ штамм ЛИВП-GFP, наработанный и очищенный, как описано ранее [Петров и др., 2013].

Бактериофаг M13K07 [Dotto et al., 1984].

2.1.4. Лабораторные животные

В работе использовали самок мышей BALB/c возраста 5-6 недель из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово, Россия). Животных содержали в пластиковых клетках при нормальном цикле день/ночь. Вода и еда были предоставлены *ad libitum*. Эксперименты с животными проводили в соответствии с рекомендациями по защите животных, используемых в научных целях (Директива EU2010/63/EU). Все эксперименты с животными были одобрены комитетом по биоэтике ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия.

2.1.5. Комбинаторные фаговые библиотеки

Иммунная комбинаторная библиотека одноцепочечных антител человека, сконструированная как описано ранее [Дубровская и др., 2007]. Представительность библиотеки составила 10^8 индивидуальных клонов.

Пептидные фаговые библиотеки: Ph.D-12, Ph.D-C7C (New England Biolabs, США).

2.1.6. Ферменты

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции *Acc65I*, *BamHI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HindIII*, *NotI*, *NheI*, *PstI* и *XhoI* (Fermentas, Литва) и *AflIII* (New England Biolabs, США).

ДНК-лигаза фага T4 (Fermentas, Литва). DremTaq Green ДНК-полимераза (Life Technologies, США).

2.1.7. Растворы

АР-буфер: 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 100 мМ Tris-HCl, pH 9.5.

Буфер для нанесения белковых проб на полиакриламидный гель: 100 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 4 % SDS, 0,2 % бромфеноловый синий, 20 %-ный глицерин.

Буфер (×6) для нанесения проб ДНК на полиакриламидный или агарозный гель: 0,25 % бромфеноловый синий, 0,25 % ксиленцианол, 30 % глицерин.

Буфер для переноса белков из полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану: 39 мМ глицин, 48 мМ Tris-HCl, 0,037 % SDS, 20 % метанол.

Буфер для ПЦР (x10): 200 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 100 мМ KCl, 100 мМ (NH₄)₂SO₄, 20 мМ MgCl₂, 1 % Triton-X100. DremTaq Green Buffer (Life Technologies, США).

Буфер для реакции лигирования 10x T4 ligase buffer” (Fermentas, Литва).

Буфер для трансформации *E. coli* №1: 10 мМ MOPS, 10 мМ RbCl, pH 7.0.

Буфер для трансформации *E. coli* №2: 100 мМ MOPS, 10 мМ RbCl, 50 мМ CaCl₂, pH 6.5

Буфер иодидный: 10 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 1 мМ EDTA, 4 мМ NaI.

Буфер карбонат-бикарбонатный: 50мМ NaHCO₃, 50мМ Na₂CO₃, pH9,5.

Буфер трис-ацетатный (ТАЕ): 20 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА, 40 мМ трис, pH 8.0.

Буфер трис-глициновый: 25 мМ Tris-HCl, pH 8.3, 192 мМ глицин, 0,1 % SDS.

Буфер трисовый (ТБР): 50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7.5.

Буфер STE: 200 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 10 мМ ЭДТА, 20 % сахароза.

Лизирующий раствор для выделения ДНК: 50мМ глюкоза, 25 мМ трис-HCl, pH 8,0, 10мМ ЭДТА.

Фосфатно-солевой буфер (ФСБР): 100 мМ NaCl, 33 мМ Na₂HPO₄, 17мМ NaH₂PO₄×12H₂O, pH 7.2.

PEG/NaCl: 20 % PEG 6000, 2,5 М NaCl.

2.1.8. Культуральные среды

Для культивирования клеток *Escherichia coli* готовили:

- Среда YТ×2. На 1 л: 16 г бактотриптона, 10 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl. pH 7.2.

- Плотная агаризованная среда YТ×2-агар. На 1 л: 16 г бактотриптона, 10 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl, 15 г бактоагара. pH 7.2.
- Среда LB. На 1 л: 10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl. pH 7.2.
- Нижний агар, на 1 л: 10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl, 15 г бактоагара. pH 7.2.
- Верхний агар, на 1 л: 10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl, 7 г бактоагара. pH 7.2.6

Питательная среда для культивирования эукариотических клеток: среда Opti-MEM производства (Life Technologies, США), с добавлением 5 % эмбриональной сыворотки телят производства (Gibco, США); среда DMEM (Биолот, Россия) с 2% сывороткой телят. Среда CD OptiCHO и CD FortiCHO (Life Technologies, США).

2.1.9. Плазмиды

pUR291, pUR-J3L, pCHm2, pCLm4/hygro, pCDNA5/FRT-DHFR-CH-CL.

pQE30 (Qiagen, США); pOG44 (Life Technologies, США); pEGFP-N1 (Clontech, США).

2.1.10. Праймеры

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, используемых в работе.

1	ForBam-1	5' -CG <u>GGATCC</u> GGTGGAAATGGCGGCGGTGAAAAC-3'
2	ForBam-2	5' -CG <u>GGATCC</u> GTAGTTATTGTAGAAAACGATAAC-3'
3	ForBam-3	5' -CG <u>GGATCC</u> GTTATTGAGGATATTACGTTTC-3'
4	ForBam-4	5' -CG <u>GGATCC</u> ACTACTGCGCTGAACATTGTAGTAG-3'
5	ForBam-5	5' -CG <u>GGATCC</u> TCGGGATTTTATTTTGAAATAGCC-3'
6	ForBam-6	5' -GCG <u>GGATCC</u> GGTGGAGATGATCCAGATCATTAC-3'
7	Back Pst-2	5' -AA <u>CTGCAG</u> AAATGAAATCAGTGGAGTAGT-3'
8	J3L Back1	5' -AA <u>CTGCAG</u> TCCACTGTATAAACG-3'
9	J3L Back2	5' -AA <u>CTGCAG</u> CGATATTTCTTTTCG-3'
10	J3L Back3	5' -AA <u>CTGCAG</u> AAACGTAATATCCTC-3'
11	J3L Back4	5' -AA <u>CTGCAG</u> GTATATGTGAATATGGC-3'
14	J3L Back9	5' -AA <u>CTGCAG</u> AATTTTCATCTACAATGTTTCAGC-3'
15	J3L Back10	5' -AA <u>CTGCAG</u> TATCTGCCTATTGATCTTC-3'

16	J3L Back12	5' -AA <u>CTGCAG</u> GTGTTCTACATATTTGGCGGCG-3'
17	J3L Back13	5' -AAAA <u>CTGCAG</u> ATTTGGTTTCATGTTTTTCGAAGCG-3'
18	PUR_SEQ1	5' -TACCAGTTGGTCTGGTGTC-3'
19	PUR_SEQ1Back	5' -TTCGTCTTCAAGAATTCTCAT-3'
20	PQE_SEQ1	5` -TATGAGAGGATCTCACCAT-3`
21	PQE_SEQ1Back	5` -TGAGGTCATTACTGGATCT-3`
22	LMB3	5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3'
23	pHEN-SEQ	5' -CTATGGGGCCCCATTCA-3'
24	ect_085_1	5' -GTAATTCGTAAACAGAGAAGC-3'
25	ect_085_back1	5' -CCCTCCTGTATATGAGAATATG-3'
26	ect_085_2	5' -GCTAGACATTTAGCCCTATGG-3'
27	ect_085_back2	5' -GCATTGGTGTCCGATCTTAG-3'
28	T7mod_dir	5' -GGCTTATCGAAATTAATACG-3'
29	BGH_rev	5' -TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
30	VL_dir_EcoRV	5' -GG <u>GATATC</u> GTGATGACCCAGTCCCC-3'
31	VL_rev_HindIII	5' -CCGTTTGATCTC <u>AAGCTT</u> GGTCCC-3'
32	VH_dir_XhoI	5' -GAGGTGCAGCTGCTC <u>GAGTCT</u> GG-3'
33	VH_rev_Acc65I	5' -GACGGTGACCAG <u>GGTACC</u> CTGGCC-3'
34	M13_pIII_F	5' -CTCTGTAGCCGTTGCTAC-3'
35	M13_PIII_96	5' -CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'
36	VL_dir_NheI	5' -GG <u>GCTAGC</u> GTGATGACCCAGTCCCC-3'
37	VL_rev_AflIII	5' -CCGTTTGATCTC <u>CTTAAG</u> GGTCCC-3'
38	VH_dir_NotI	5' -GAGGTGCAGCTGCTC <u>GCGGCCG</u> GG-3'
39	VH_rev_EcoRV	5' -GACGGTGACCAG <u>GATATC</u> CTGGCC-3'
40	Hchain_seqBack	5' -GGCTTTGTCTTGCCGTTATGC- 3'
41	Hchain_seqFor	5' -ACGTTTCTCACGAGGATCCCG- 3'
42	CMV for	5` -CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3`

Сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Олигонуклеотиды синтезированы фосфанатным методом [Froehler et al., 1986] во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Горбуновым Ю.В. и стандартным фосфоамидным методом с очисткой с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН.

2.2 Методы

2.2.1. Амплификация библиотеки антител

Из исходной фаговой библиотеки антител человека, сконструированной ранее, отбирали аликвоту, содержащую приблизительно 10^8 клонов, и переносили в 50 мл питательной среды YТ×2, содержащей 1% глюкозу и 100 мкг/мл ампициллина. Культивировали при 37°C с постоянным перемешиванием до плотности культуры (OD_{600}) равной 0,5, после чего инфицировали подростую культуру фагом-помощником M13K07, добавляя его в количестве 20 фаговых частиц на 1 бактерию (количество бактерий определяли по оптической плотности культуры, исходя из того, что 1 OD_{600} соответствует 8×10^8 бактерий/мл). После инкубации в течение 30 мин при 37°C, клетки осаждали центрифугированием при 3000g 10 мин и ресуспендировали осадок в 30 мл YТ×2, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл канамицина. Затем инфицированные фагом-помощником клетки переносили в 270 мл YТ×2, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл канамицина, и растили в течение ночи при 30°C с постоянным перемешиванием.

На следующий день центрифугировали культуру клеток при 10000g 10 мин. Затем отбирали супернатант, содержащий бактериофаги, смешивали с 1/5 объема ПЭГ/NaCl и инкубировали во льду в течение 2 часов. Суспензию фагов осаждали центрифугированием при 10000g 30 мин. Осадок, состоящий из фагового преципитата, ресуспендировали в 40 мл воды и, после добавления 8 мл ПЭГ/NaCl, оставляли во льду на 30 мин. Затем повторно осаждали фаговый преципитат при 10000g в течение 30 мин. Супернатант вместе с остатками ПЭГ удаляли, а осадок ресуспендировали в 2 мл ФСБР, после чего полученную суспензию центрифугировали при 5000g в течение 10 мин для удаления остатков бактериальных клеток.

Титр фаговых частиц определяли методом последовательных разведений титрования в двойном агаре. Выход фаговых частиц составлял приблизительно 10^{12} - 10^{13} БОЕ/мл.

2.2.2. Аффинное обогащение библиотеки специфичными фаговыми антителами

Аффинное обогащение библиотеки проводили как описано ранее [Braunagel и Little, 2009], с использованием во всей процедуре 0,1% Твин-20.

В каждом из 2-х последовательных раундов селекции использовали 10^{12} - 10^{13} фаговых частиц, несущих на своей поверхности scFv фрагменты антител. Антиген, растворенный в ФСБР в соответствующей концентрации от 50 до 100 мкг/лунка, сорбировали на полистироловые планшеты («Медполимер», Россия) в 12-16 часов при комнатной температуре. Удаляли антиген и блокировали места неспецифического связывания 3% раствором БСА в первом раунде и 3 % раствором сухого молока во втором раунде в ФСБР в течение часа, после чего в аналогичном растворе вносили в лунки около 10^{12} б.о.е. фаговой библиотеки мини-антител и инкубировали 1 ч при 37°C. После этого лунки планшета промывали 20 раз ФСБР-Твин 0.1%, 20 раз ФСБР, а затем связавшиеся фаговые частицы элюировали 100 мкл 100 mM раствора триэтиламина. Клетки *E.coli* TG1 в объеме 30 мл, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, инфицировали 200 мкл полученного элюата. Смесь инкубировали 30 мин при 37°C, затем центрифугировали при 3000g в течение 10 мин. Инфицированные клетки высевали на чашку Петри (24×24 см) с агаризованной средой YТ×2, содержащей 1% глюкозу и 100 мкг/мл ампициллина, и инкубировали в термостате в течение ночи при 30°C. Бактериальную культуру, содержащую фагмиды, собирали шпателем, после добавления 1-2мл среды YТ×2, содержащей 20% глицерина. Глицериновый сток хранили при -70°C.

2.2.3. Выделение фаговых одноцепочечных антител

Клетки *E.coli* TG1, содержащие фагмиды, выращивали в жидкой среде YТ×2 при 37°C в течение ночи. В пробирки с 200 мкл YТ×2 с 1% глюкозой и 100 мкг/мл ампициллина переносили 2 мкл суспензии клеток. Культуру *E. coli*, выращенную при постоянном качании при 37°C до плотности $OD_{600}=0,5$, инфицировали фагом-помощником M13K07, добавляя его в количестве 20 фаговых частиц на 1 бактерию, и инкубировали при 37°C в течение 30 мин статично и 1 час при постоянном качании. После чего клетки осаждали центрифугированием при 5000g в течение 10 мин, осадок ресуспендировали в 50 мкл среды YТ×2 и переносили в 10 мл среды YТ×2, с ампициллином (100 мкг/мл) и канамицином (50 мкг/мл), а затем

инкубировали при постоянном перемешивании при 30°C в течение 12-16 часов. На следующем этапе клетки осаждали центрифугированием 10 мин при 10000g, супернатант смешивали с 1/5 объема ПЭГ/NaCl и выдерживали во льду в течение 2 часов. Суспензию фагов осаждали центрифугированием при 10000g 30 мин. Осадок, состоящий из фагового преципитата, ресуспендировали в 1 мл воды и, после добавления 1/8 объема ПЭГ/NaCl, оставляли во льду на 30 мин. Затем повторно осаждали фаговый преципитат при 5000g в течение 30 мин. Супернатант вместе с остатками ПЭГ удаляли, а осадок ресуспендировали в 500 мкл ФСБР, после чего полученную суспензию центрифугировали при 10000g в течение 10 мин для удаления остатков бактериальных клеток. Выход фаговых частиц составлял приблизительно 10^{14} БОЕ /мл.

2.2.4. Иммуноферментный анализ

Антиген разводили в ФСБР до требующейся концентрации, наносили в лунки 96-луночных планшетов (Greiner, Германия) и инкубировали в течение ночи при +4° С. На следующем этапе удаляли антиген и промывали лунки буфером ФСБР трижды. Участки неспецифического связывания блокировали 3 % раствором БСА либо 5% раствором обезжиренного молока в ФСБР в течение 2 часов при 37°C, после чего, повторяли промывку. Затем добавляли антитела в буфере ФСБР-Твин 0.1% (в случае фаговых антител концентрация составляла 10^{11} БОЕ/мл, в случае сывороток мышей, начиная с разведения 1:200, с шагом разведения 1:2.) и инкубировали в течение 1 часа при 37°C с качанием. Промывали три раза буфером ФСБР с 0.1% Твин-20, и трижды ФСБР. Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли инкубацией с поликлональными антителами кролика к фагу M13 (в разведении 1:12000) в буфере ФСБР-Твин 0,1% с последующим связыванием с антивидовым конъюгатом щелочной фосфатазы в разведении 1:4000, а в случае полноразмерных антител с соответствующим антивидовым конъюгатом антител со щелочной фосфатазой. Затем лунки последовательно промывали ФСБР с 0,2% Твин-20 трижды и AP-буфером трижды; иммунные комплексы окрашивали паранитрофенилфосфатом в AP-буфере.

В случае проведения ИФА с использованием бактериофагов, несущих пептид, антиген разводили в карбонат-бикарбонатном буфере до концентрации 2 мг/мл и

сорбировали в течение ночи при +4° С. Все промывки делали, как описано выше, но с использованием ТБР с Твин-20. Бактериофаги последовательно разводили в ТБР с 0,1% Твин-20 с шагом 1:3, начиная с концентрации 10¹¹ БОЕ/мл. Иммуные комплексы выявляли инкубацией с поликлональными антителами кролика к фагу M13 с последующим связыванием с антивидовым конъюгатом щелочной фосфатазы в разведении 1:8000. В качестве хромогена использовали пара-нитрофенилфосфат в AP-буфере. Сигнал лунок без антител использовали в качестве отрицательного контроля. Контролем неспецифического связывания служило связывание антитела с бактериофагом, не несущим пептид.

2.2.5. Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса [Birnboim и Doly, 1979] с нашими модификациями. Бактериальные клетки, несущие плазмидные ДНК, выращивали до плотности OD₆₀₀=1,0 в 5 мл среды YT×2 с необходимым антибиотиком при 37°С в течение ночи. После осаждения клеток при 3000g в течение 5 минут об/мин, ресуспендировали осадок в 100 мкл лизирующего раствора и оставляли на 5 мин при комнатной температуре. Затем аккуратно вносили 200 мкл раствора 0,2M NaOH с 1% SDS и выдерживали смесь до осветления. После чего добавляли 150 мкл 3 M ацетата Na (pH 4,8), резко перемешивали и инкубировали в течение 15 минут на льду. После центрифугирования образцов в течение 10 минут при 15000g, супернатант смешивали с двумя объемами 96% этанола и инкубировали в течение 20 минут при -20°С. Затем осаждали ДНК центрифугированием в течение 10 минут при 15000g. К осадку, растворенному в 100 мкл воды, добавляли 100 мкл 5 M LiCl, инкубировали в течение 10 минут при 70°С и центрифугировали в течение 10 минут, 15000g. Супернатант смешивали с 5 объемами 96% этанола, оставляли на 10-20 минут при -20°С и центрифугировали 10 минут при 15000g. После высушивания осадка, к нему добавляли 100 мкл воды, 20 мкл 5M NaCl и 250 мкл 96% этанола для переосаждения и инкубировали в течение 20 минут при -20°С. Пробы центрифугировали 10 минут при 15000g, осадок сушили от остатков спирта и растворяли в 20 мкл воды. Плазмидные ДНК хранили при -20°С.

2.2.6. Определение нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих переменные домены иммуноглобулинов

Для проведения полимеразной цепной реакции в качестве матриц использовали фагмидные ДНК, выделенные щелочным методом. Олигонуклеотиды LMB3 и рHEN-SEQ (Таблица 1) использовали в качестве праймеров для синтеза VH- и VL-фрагментов. Денатурацию, отжиг праймеров и реакцию полимеризации проводили при 94°C, 52°C и 72°C, соответственно.

Перед постановкой реакции Сэнгера анализируемую ДНК очищали при помощи GTG-агарозного геля. Для определения нуклеотидных последовательностей scFv-генов проводили секвенирующие реакции в объеме 30 мкл с использованием праймеров LMB3/рHEN-SEQ, BigDye® Terminator v3.1 Cycling Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Очистку продуктов реакции Сэнгера проводили гельфильтрацией через колонки с сорбентом Sephadex G-50 Superfine (GE HealthCare). Электрофоретическое разделение образцов любезно проводил к.б.н. А.Ю. Тикунов, лаборатория молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН с использованием капиллярного электрофореза в Genetic Analyzer for Resequencing & Fragment Analysis 3500 (Applied Biosystems, США), часть образцов передавали в Межинститутский центр секвенирования ДНК, ИХБФМ СО РАН. Для анализа последовательностей использовали программы SeqMan Lasergene, Vector NTI Suite 8 и MEGA 7.0.18. Полученные последовательности сравнивали с последовательностями, размещенными в базе данных NCBI BLAST (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/>) и IMGT (URL: <http://www.imgt.org>).

Определенные нуклеотидные последовательности были задепонированы в базу данных GenBank (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

2.2.7. Электрофоретический анализ белков

Электрофоретическое разделение белков проводили по Лэммли [Laemmli et al., 2003] в прерывистой буферной системе в присутствии 0,1% SDS в трис-глициновом буфере. Использовали 5% концентрирующий (0,125 М трис-НСl, рН6.8, 0,1% SDS, 5% акриламид, 0.5% N',N-метиленбисакриламид) и 12,5% разделяющий (0,375 М трис-НСl, рН8.8, 0,1% SDS, 12,5% акриламид, 1% N',N-метиленбисакриламид) гели. Для денатурации белка образцы смешивали с буфером для нанесения в соотношении

1:1, прогревали в течение 5 мин при 95°C, затем наносили на ПААГ. При проведении электрофореза в редуцирующих условиях использовали буфер, содержащий 0,1 М дитиотреитол. Электрофорез вели в режиме 8 В/см. Окрашивание геля проводили в растворе красителя Coomassie Brilliant Blue R-250 в 20% этаноле, 10% уксусной кислоте, отмывку - кипячением в дистиллированной воде. Окрашенный гель сканировали или фотографировали.

2.2.8. Вестерн-блот анализ белков

Лизаты клеток *E.coli*, продуцирующие белки J3LΔn, либо другие белковые молекулы, разделяли электрофоретически в полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану при помощи электропереноса [Towbin et al., 1984] в буфере для переноса в течение 4 часов при силе тока 0.65мА на 1 см² геля. После блокировки мест неспецифического связывания 5% раствором молока в ФСБР в течение 1 часа при 37°C, стрипы инкубировали с соответствующими антителами (фаговыми, полноразмерными человеческими антителами, либо сыворотками человека или мыши) в течение 60 минут при 37°C. В случае фаговых антител на следующем этапе добавляли анти-M13 кроличью сыворотку в разведении 1:12000 в растворе ФСБР с 0,1% Твин-20. Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли антивидовым конъюгатом щелочной фосфатазы в разведении. После инкубирования с конъюгатом и промывки раствором 0,1% Tween-20-ФСБР стрипы дополнительно промывали AP-буфером. В качестве хромогена использовали смесь 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфата (BSIP) и нитро-тетразолиевого голубого (NBT).

2.2.9. Исследование вируснейтрализующей активности иммуноглобулинов в отношении ортопоксвирусов

Суспензию ортопоксвирусов разводили до уровня примерно 25 БОЕ на лунку и смешивали с равным объёмом антител либо сывороток соответствующего разведения. Смеси антител с вирусами инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Аликвоты из каждой смеси наносили на монослой клеток линии *Vero E6* в лунки 24-луночных культуральных планшетов (TPP, Швейцария). Через 2 часа смесь удаляли, клетки промывали средой DMEM и культивировали в питательной среде DMEM с 2% сывороткой телят при 37 °C. Монослой клеток окрашивали 0,1% раствором кристаллического фиолетового с 10% формалином через 3-4 дня после

инфицирования, визуализируя бляшки. В контрольные лунки вносили суспензию вируса без добавления мышинной сыворотки. В качестве отрицательного контроля использовали отобранное против тиреоглобулина фаговое АТ anti-Thy [Ewert et al., 2003], которое не связывало ортопоксвирусы. В качестве положительного контроля – МКА мыши 2D5, отобранное против ортопоксвирусов (Ichihashi и Oie, 1996). Уровень нейтрализации рассчитывали 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.

2.2.10. Атомная силовая микроскопия

Связывание фаговых антител с ортопоксвирусными частицами исследовали с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Анализ проводился на воздухе на сканирующем зондовом микроскопе MultiMode 8, работающим в режиме постукивания с использованием силиконовых зондов RTESP (Bruker). Капли анализируемых образцов: фаговое антитело, фаговое антитело + ВОВ, М13К07 + ВОВ (5 мкл) наносили на свежеприготовленные слайды слюды (НТ-МДТ, Россия) и оставляли для адсорбции на поверхности в течение 60 с. Затем субстрат дважды промывали водой высокой чистоты mQ и сушили в потоке сухого газообразного аргона. Изображения были подготовлены с использованием программного обеспечения NanoScope Analysis v.1.40 (Veeco Instruments, Inc.).

2.2.11. Амплификация фрагментов гена J3L

В качестве матрицы в полимеразной цепной реакции с Taq-ДНК-полимеразой использовали плазмидную ДНК, содержащую ген J3L ВОК. Реакцию проводили в буфере для ПЦР, при этом один цикл состоял из: I стадия – денатурация матрицы - 94°C, 1 мин, II стадия – отжиг праймеров на матрице - 50°C, 50 сек, III стадия – реакция полимеризации - 72°C, 1 мин. Всего проводили 30 циклов ПЦР. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала по 10 пкм праймеров, указанных в пункте **2.1.10**, смесь dNTP (по 0,25 mM каждого), 5 мкл буфера для ПЦР, 0,01 мкг раствора плазмидной ДНК pUR-J3L, 5 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы. Продукты амплификации анализировали в 1 % агарозном геле или 6% полиакриламидном геле.

В случае амплификации гена, кодирующего белок р35 вируса эктромелии, штамм К1, в качестве матрицы для ПЦР использовали суспензию вируса эктромелии

(конц. 3мкг/мкл, в реакцию брали 1 мкл). Программа для амплификации: 1. 95°C – 1 мин – 1 цикл; 2. 95°C – 10 сек, 58°C – 10 сек, 72°C – 1 мин – 36 циклов; 3. 72°C – 1 мин.

2.2.12. Ферментативный гидролиз ДНК

Реакционная смесь обычно содержала 0,2-10 мкг ДНК, 1-2 ед. активности энонуклеазы рестрикции на 1 мкг ДНК в соответствующем буфере. Гидролиз проводили при 37°C в течение 60 минут. Полученные в результате гидролиза фрагменты ДНК анализировали в 6% полиакриламидном геле.

2.2.13. Экстракция фрагментов ДНК из агарозного геля

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили с использованием «QIAquick Gel Extraction Kit» («QIAGEN», США) согласно инструкции производителя.

2.2.14. Встраивание фрагментов ДНК в векторную плазмиду

Для встраивания фрагментов ДНК в векторную плазмиду в лигазную смесь вносили 0,5 пкМ ДНК векторной плазмиды, расщепленной эндонуклеазами рестрикции, и эквимольные количества фрагментов, обработанных теми же рестриктазами, и ДНК-лигазу фага Т4. Лигирование вели в течение 2-4 часов при 11°C в буфере, содержащем 66мМ трис-НСl, рН 7.6, 8 мМ MgCl₂, 5 мМ ДТТ и 1 мМ АТФ. На 1мкг ДНК использовали 1-2 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т4.

2.2.15. Трансформация клеток *E. coli* плазмидной ДНК

Трансформацию клеток *E. coli* проводили по описанному методу [Маниатис и др., 1984] с модификациями. Клетки осаждали центрифугированием при 3000g 1 мин из 1 мл клеточной культуры, выращенной до плотности OD₆₀₀=0,4-0,6, и ресуспендировали на льду в 1 мл буфера для трансформации №1. Затем центрифугировали суспензию при 3000g в течение 1 мин, осадок растворяли в буфере для трансформации №2 и оставляли во льду на 15 мин. После центрифугирования при 3000g в течение 1 мин осадок растворяли в 200 мкл буфера для трансформации №2. К полученной клеточной суспензии добавляли 3 мкл DMSO и плазмидную двухцепочечную ДНК (не более 10 мкл раствора) и инкубировали во льду в течение

30 мин. Затем клетки прогревали при 42°C в течение 2 мин, добавляли 1 мл среды 2×YT и инкубировали 1 час при 37°C, после бактерии высевали на агаризованную среду с соответствующим антибиотиком. Эффективность данного метода трансформации составляет $10^7 - 10^8$ колоний на 1 мкг ДНК.

2.2.16. Электрофоретическое фракционирование ДНК

Фракционирование фрагментов ДНК с помощью электрофореза проводили как описано ранее [Остерман, 1981]. Использовали 0.8% или 1% агарозу или 6% ПААГ с соотношением акриламид: бисакриламид 30:1 в трис-ацетатном буфере. Пробы наносили в буфере для нанесения образцов ДНК. Электрофорез вели в режиме 10 В/см. Визуализацию ДНК осуществляли окрашиванием геля раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл).

2.2.17. Конструирование плазмидных ДНК, несущих гены тяжелых и легких цепей антиортопоксвирусных антител

Плазмидная ДНК pCHm2, а также ПЦР-фрагмент, кодирующий VH-домен антител, были гидролизованы эндонуклеазами рестрикции *XhoI* и *Acc65I*. Аналогично проводили гидролиз плазмидной ДНК pCLm4/hygro и ПЦР-фрагмента, кодирующего VL-домен антител, эндонуклеазами рестрикции *EcoRV* и *HindIII*. Гидролизованные продукты разделяли электрофоретически в 1% агарозном геле. Фрагменты, соответствующие по размеру ожидаемым продуктам, вырезали и элюировали из геля с помощью набора для выделения ДНК “QIAquick Gel Extraction Kit” (QIAGEN) по инструкции производителя. Встраивание фрагментов ДНК в векторную плазмиду проводили как описано в п. 2.2.14.

2.2.18. Выделение плазмидной ДНК, не содержащей эндотоксинов

Для трансфекции в эукариотические клетки плазмидную ДНК выделяли с использованием набора “PureYield plasmid midiprep system” (Promega). Клетки *E.coli* XL1-blue трансформировали необходимой плазмидой и выращивали в 100 мл среды LB в течение ночи при 37 °C и непрерывном качании. Затем выделяли ДНК согласно инструкции производителя с использованием вакуумного насоса (Millipore). Растворы плазмид, элюированные с колонок, дополнительно переосаждали 3-5 объемами этилового спирта, центрифугировали 5 мин при 14000 g, осадок промывали

70% этиловым спиртом и растворяли в воде, не содержащей нуклеаз. Концентрацию нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически на спектрофотометре “SmartSpec Plus” (Bio-Rad) при длине волны 260 нм. В расчетах полагали, что оптическая плотность равна 1,0 для раствора ДНК с концентрацией 50 мкг/мл [Sambrook J. et al., 2001]. После определения концентрации растворы ДНК хранили при -20 °С.

2.2.19. Трансфекция эукариотических клеток плазмидными ДНК

Клетки CHO-K1 культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в среде Opti-MEM (LifeTechnologies, США), содержащей 10% бычьей фетальной сыворотки (Биолот, Россия) и 2 мМ глутамин (Биолот, Россия). Перед трансфекцией клетки высевали в шестилуночные планшеты (Nunc, Дания) и выращивали до плотности 90-95%. Трансфекцию осуществляли с использованием Lipofectamin 2000 (Invitrogen, США) согласно инструкции.

Разводили 12 мкг плазмидной ДНК (по 6 мкг плазмидных ДНК, кодирующих легкую и тяжелую цепи иммуноглобулина) в 600 мкл Opti-MEM. Смешивали 30 мкл Lipofectamin 2000 с 600 мкл Opti-MEM и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Оба раствора объединяли, аккуратно перемешивали и инкубировали 20 мин при комнатной температуре, затем 200 мкл полученной суспензии добавляли в каждую лунку с клетками CHO-K1. Через 48, 72, 96 и 120 часов собирали культуральную жидкость и заменяли среду на Opti-MEM, содержащую 5% фетальной бычьей сыворотки с низким содержанием иммуноглобулинов. Собранную культуральную жидкость центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин. К отобранному супернатанту добавляли азид натрия до конечной концентрации 0,05% и использовали для выделения антител.

2.2.20. Очистка полноразмерных антител с помощью аффинной хроматографии

Рекомбинантные антитела выделяли хроматографически с использованием сорбента “Protein A sepharose CL-4B” (GE Healthcare). Перед хроматографией культуральную жидкость центрифугировали 10 мин при 15000 g и фильтровали через 0,45 мкм полиэфирсульфоновый фильтр. Антитела наносили на колонку с сорбентом “Protein A sepharose CL-4B” со скоростью 0,5 мл/мин с использованием хроматографа “BioLogic LP System” (Bio-Rad). Колонку промывали ФСБР,

содержащего 0,05% азид натрия в качестве консерванта. При выделении антител из культуральной среды, содержащей эмбриональную телячью сыворотку, антитела быка связавшиеся с сорбентом, элюировали 0,1 М цитратным буфером с pH 5,0. Рекомбинантные антитела элюировали 0,1 М цитратным буфером с pH 3,0. pH доводили до значения 6,8, добавляя 1,5 М трис-HCl pH 8,8.

Раствор антитела концентрировали ультрафильтрацией с использованием фильтров “Amicon ultra-4” (Millipore) с порогом отсечения 50 кДа. С использованием этих же фильтров производили замену буфера на ФСБР с 0,05% азидом натрия. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм на спектрофотометре “SmartSpec Plus” (Bio-Rad). В расчетах полагали, что оптическая плотность раствора иммуноглобулинов IgG с концентрацией 1 мг/мл составляет около 1,41 [Hale et al., 2000]. Раствор антитела фильтровали через 0,22 мкм фильтр и хранили при 4 °C в концентрации не менее 1 мг/мл.

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

Для клонирования была использована кассетная плаزمиды pCDNA5/FRT-DHFR-SH-CL, содержащая уникальные сайты *EcoRV* и *NotI*, а также *NheI* и *AflII*, для клонирования генов, кодирующих переменные домены тяжелых и легких цепей антитела человека, соответственно. Для наработки полноразмерных антител человека против ортопоксвирусов в эту плазмиду встраивали фрагменты ДНК, кодирующие V_H и V_L домены антител. Эти фрагменты ДНК были синтезированы в ПЦР с использованием плазмидных ДНК pCHm2-1A и pCLm4/hygro-1A, pCHm2-8E и pCLm4/hygro-8E, и праймеров VH_dir_NotI и VH_rev_EcoRV , содержащих на 5'-концах сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *NotI* и *EcoRV*, соответственно, для встраивания V_H -гена, а также праймеров VL_dir_NheI и VL_rev_AflII , содержащих на 5'-концах сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *NheI* и *AflII*, соответственно, для встраивания V_L -гена. В результате были получены плазмиды pCDNA5/FRT-DHFR-full_1A и pCDNA5/FRT-DHFR-full_8E, кодирующие тяжелые и легкие цепи полноразмерных антител. Правильность встройки тяжелой цепи проверяли в реакции секвенирования с использованием праймеров $Hchain_seqBack$ и $Hchain_seqFor$, легкой цепи – $CMV\ for$ и BGH_rev . Плазмидную ДНК нарабатывали в клетках *E.coli*,

очищали с помощью набора PureYield Plasmid midiprep (Promega) и использовали для последующей трансфекции эукариотических клеток.

Клетки CHO-S/FRT культивировали при 37°C в атмосфере 8% CO₂ в среде CD OptiCHO (LifeTechnologies, США), содержащей 6 mM глутамин (Биолот, Россия) в 125 мл колбах эрленмейера на шейкере для CO₂ инкубаторов Celltron (Infors, Швейцария) при 150 об/мин. Перед трансфекцией клетки культивировали 3-4 пассажа, не позволяя достигать плотности более 2×10⁶ кл/мл. За 24 часа до трансфекции клетки рассеивали в шестилуночные планшеты в концентрации 3×10⁵ кл/мл. Трансфекцию осуществляли с использованием Lipofectamin 2000 (Invitrogen, США) согласно инструкции.

Для получения штаммов, продуцирующих антитела fh1A и fh8E, суспензионные клетки линии CHO-S\FRT одновременно трансфецировали двумя плазмидами: вспомогательной плазмидой pOG44 (Life Technologies) с геном, кодирующим флиппазу, и либо сконструированной плазмидой pCDNA5/FRT-DHFR-full_1A, либо pCDNA5/FRT-DHFR-full_8E.

Разводили по 3 мкг плазмидных ДНК на 1 лунку шестилуночного планшета (использовали разные соотношения плазмид pCDNA5/FRT-DHFR-full_1A (либо pCDNA5/FRT-DHFR-full_8E) и pOG44) в 100 мкл Opti-MEM. Смешивали 12 мкл Lipofectamin 2000 с 100 мкл Opti-MEM и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Оба раствора объединяли, аккуратно перемешивали и инкубировали 20 мин при комнатной температуре, затем полученную суспензию добавляли в каждую лунку с клетками CHO-S\FRT. Эффективность гомологичной рекомбинации оценивали через 72 часа после трансфекции методом проточной цитофлуориметрии с использованием цитофлуориметра NovoCyte (ACEA).

Затем полученные пулы клеток в концентрации 0,5×10⁶ клеток/мл засеивали в селективную среду CD OptiCHO, содержащую 80 мкг/мл селективного антибиотика Гигромицин В и 6 mM глутамин (Биолот, Россия). Селективную среду меняли каждые 3-4 дня. После достижения 90% жизнеспособности в популяциях клеток, проводили амплификацию целевого гена. Для этого к аликвотам клеток в селективной среде CD OptiCHO, содержащей 80 мкг/мл селективного антибиотика гигромицин В и 6 mM глутамин (Биолот, Россия), добавляли метотрексат (TEVA, Израиль) в концентрациях – 200 нМ, 400 нМ, 800 нМ, 1600 нМ.

Каждые 3-4 дня меняли селективную среду с метатрексатом. Отдельные клоны получали методом предельных разведений, после достижения 90% жизнеспособности в поликлональных популяциях клеток.

Очистку антител проводили, как описано в п. 2.2.20.

2.2.22. Оценка аффинности полноразмерных антител человека к рекомбинантному белку p35Δ12 ВОК с использованием оптического биосенсора ProteOn XPR 36

Константы аффинности полноразмерных антител fh1A, fh8E и fhb9 с рекомбинантным белком p35Δ12 были определены на оптическом биосенсоре ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Поверхность сенсорного чипа GLC (Bio-Rad) активировали смесью 125 мкл 40 мМ 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (EDAC) и 125 мкл 10 мМ N-гидроксисульфосукцинимид (Sulfo-NHS) в течение 1 мин со скоростью 150 мкл/мин. После чего ковалентно иммобилизовали белок A *Staphylococcus aureus*, разведённый в 10 мМ растворе ацетата натрия с pH 4,5 до концентрации 15 мкг/мл, на активированную поверхность со скоростью 25 мкл/мин до уровня 2000 RU. На поверхность вертикальных каналов L1 и L2 иммобилизовали антитела до уровня 1500–1800 RU. Референсные каналы L3 и L4 готовили аналогичным образом, используя PBST без антител. Эксперименты по связыванию проводили в буфере ФСБР с добавлением 0,005% tween-20. В качестве анализа использовали последовательные двухкратные разведения белка p35Δ12, начиная с концентрации 500 нМ, которые пропускали через биосенсор в горизонтальной ориентации со скоростью потока 25 мкл / мин. Связывание длилось 10 мин, диссоциация комплексов – 30 мин. Для вычисления константы аффинности проводили глобальный анализ данных в программе ProteOnManager v.3.1.0 (Bio-Rad) с использованием модели односайтового связывания. Данные корректировали вычитанием сигнала, полученного с interspot-областей чипа, не содержащих иммобилизованного лиганда.

2.2.23. Нарботка и очистка белка p35Δ12

Рекомбинантный белок p35Δ12 ВОК очищали из цитоплазматической фракции индуцированных клеток *E.coli* XL1Blue/pQE-p35Δ12 с помощью аффинной хроматографии с использованием носителя Ni-NTA Sepharose (Sigma, США)

согласно инструкции производителя. Индуцированные клетки *E.coli* XL1Blue/pQE-r35Δ12 осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин, затем осадок растворяли в 1/10 объема буфера STE, выдерживали 20 мин во льду, после чего проводили центрифугирование при 7000 g в течение 6 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в 5 мМ MgSO₄ и выдерживают 10 мин во льду, затем центрифугировали при 16000 g в течение 10 мин. Полученный супернатант, представляющий собой периплазматическую фракцию, переносили в чистые пробирки, а осадок растворяли в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора. Полученную суспензию центрифугировали при 16000 g 10 минут, после чего переносили супернатант, представляющий собой раствор цитоплазматических белков, в чистую пробирку. Полученные клеточные фракции анализировали электрофоретически в 12,5 % ПААГ в редуцирующих условиях по Лэммли [Laemmli et al., 2003].

Хроматографическую колонку, содержащую 1 мл Ni-NTA агарозы (Sigma, США) уравнивали буфером А (50 мМ Na-фосфатный буфер рН 8.0, 300 мМ NaCl, 5 мМ Трис-НСl) и наносили 6 мл цитоплазматической фракции, содержащей белок р35Δ12, со скоростью потока 1 мл/мин. Колонку промывали 20 мл буфера А, после чего элюировали неспецифически сорбирующиеся белки *E.coli* 20 мл 25 мМ имидазола в буфере А. Рекombинантный белок элюировали 10 мл 100 мМ имидазола в буфере А, а затем проводили дополнительную элюцию в денатурирующих условиях 10 мл буфера, содержащего 50 мМ Трис-НСl рН 8.0, 6 М гуанидин-НСl. Полученные белковые фракции диализовали против 150 мМ NaCl, Трис-НСl рН 7.5 (две смены по 18 ч при 5°C) и анализировали электрофоретически в 12,5 % ПААГ в редуцирующих условиях по Лэммли.

Мономерную фракцию белка отделяли хроматографически на колонке с носителем Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare). Очищенный белок р35Δ12 концентрировали в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР, 100 мМ NaCl, 50 мМ Na₂HPO₄, рН 7.4) с использованием фильтров Amicon Ultra-4 10K (Millipore). Концентрацию очищенного белка р35Δ12 ВОК проводили по методу Брэдфорда [Bradford, 1976], используя бычий сывороточный альбумин для построения калибровочной кривой. Общий выход составил 300 мг из 1 л культуры клеток *E. coli*.

2.2.24. Иммунизация мышей белком p35Δ12 ВОК

Работа с животными проводилась в соответствии с принципами гуманной и экспериментальной практики, сформулированными в Европейской директиве 2010/63/EU. Все эксперименты с животными были одобрены комитетом по биоэтике ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия. Мыши размещались в пластиковых клетках при нормальном цикле день\ночь. Вода и еда были предоставлены *ad libitum*.

Для иммунизации использовали самок мышей BALB/c возраста 5-6 недель, приобретенных в питомнике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово, Россия). Очищенный белок p35Δ12 разводили в ФСБР и вводили внутривентриально в дозировке 10 мкг на мышь одновременно с полным адъювантом Фрейнда (Sigma, США), общий объем инъекции – 500 мкл. Через 2 недели иммунизацию повторяли, заменив полный адъювант Фрейнда неполным адъювантом (Sigma, США). Через 14 дней после второй иммунизации собирали кровь из лицевой вены.

Сыворотку выделяли из свернувшихся образцов крови центрифугированием, после чего образцы сыворотки инкубировали 30 мин при 56°C для инактивации белков комплемента. Эффективность иммунизации оценивали иммуноферментным анализом (ИФА) и вестерн-блот анализом.

2.2.25. Исследование взаимодействия антиортопоксвирусных антител с клетками, зараженными ВОВ, методом лазерно-сканирующей микроскопии

Для проведения лазерно-сканирующей микроскопии к монослою клеток *Vero* E6, выращенных в 35 мм чашках Петри для микроскопии (Ibidi, Германия), добавляли суспензию ВОВ (280 БОЕ), штамм ЛИВП-GFP [Петров и др., 2013], разведенную в 100 мкл питательной среде DMEM с 2% эмбриональной сывороткой. После инкубации в течение 1 часа при 37 °C клетки отмывали питательной средой 3 раза. Через 2 дня зараженные клетки фиксировали 10% раствором формалина, промывали ФСБР и блокировали 3% бычьим сывороточным альбумином 1 час при 37 °C. Затем к фиксированным клеткам добавляли сыворотки иммунизированных мышей в ФСБР в разведении 1:200 и инкубировали 1 час при 37 °C. После промывания клеток стерильным ФСБР связавшиеся антитела выявляли поликлональными антителами козы против IgG (H+L) мыши конъюгированными с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 633. Через час инкубации клетки промывали

стерильным ФСБР и добавляли 300 нМ раствор DAPI (Life technologies, США) в ФСБР для окрашивания клеточных ядер. В качестве отрицательного контроля использовали нормальную мышиную сыворотку.

Полноразмерное антитело человека fh1A использовали в качестве положительного контроля. Антитело инкубировали аналогично мышиным сывороткам и выявляли с использованием поликлональных антител козы против IgG (H+L) человека конъюгированных с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 633.

Изображения специфического взаимодействия антител с клетками, зараженными ВОВ ЛИВП-GFP, получали с помощью конфокального микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) с использованием 20-кратного объектива. Флуоресцентные метки DAPI, GFP и Alexa Fluor 633 возбуждали на длинах волн 405 нм, 488 нм и 633 нм, соответственно; эмиссию детектировали на длинах волн 440-480 нм, 490-530 нм и 630-700 нм, соответственно. Для получения и обработки изображения использовали пакет программ ZEN black edition (Carl Zeiss, Германия).

2.2.26. Амплификация пептидных библиотек

Аликвоту ночной культуры клеток *E. coli* ER2738 инкубировали при 37°C до оптической плотности $OD_{600} = 0.01-0.05$ в 50 мл LB среды с тетрациклином (50 мг/мл), затем инфицировали фаговой библиотекой Ph.D-12 либо Ph.D-C7C с множественностью инфицирования 1:20 (20 фаговых частиц на 1 бактерию) и инкубировали при 37°C 4,5-5 часов при качании. После этого зараженные клетки осаждали центрифугированием при 12000 g в течение 10 минут при температуре +4°C. К полученному супернатанту, содержащему бактериофаги, добавляли 1/6 объема ПЭГ/2,5мМ NaCl и оставляли во льду на 2 часа. ПЭГ-фаговый преципитат осаждали центрифугированием при 12000g 15 мин при температуре +4°C, супернатант сливали и центрифугировали повторно. Осадок ресуспендировали в 1 мл буфера, содержащего 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5) и 150 мМ NaCl, и, добавив 180 мкл ПЭГ/2,5мМ NaCl, инкубировали во льду 20 - 60 мин, после чего вновь проводили осаждение фагового преципитата при 5000g в течение 10 мин при температуре +4°C. Супернатант вместе с остатками полиэтиленгликоля тщательно удаляли и ресуспендировали осадок в 50 мкл ФСБР. Хранили сток при -20°C.

Для оценки выхода фаговых частиц клетки *E. coli* ER2738 культивировали в течение ночи в среде LB с тетрациклином (50 мг/мл) при 37°C, затем засеивали аликвоту в свежую среду. Фаговые частицы из исходного стока разводили в ФСБР до разведения 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} и смешивали 10 мкл с 200 мкл экспоненциальной культуры клеток *E. coli* ER2738 (оптическая плотность $OD_{600} = 0.01-0.05$), инкубировали около 5-ти минут. После этого полученные разведения смешивали с 4 мл верхнего агара и разливали по чашкам Петри с предварительно залитым нижним агаром, содержащим 50 мкг/мл X-Gal, 40 мкг/мл IPTG. Чашки инкубировали в течение ночи при 37°C. Титр фагов определяли по формуле: $C_{\text{БОЕ/мл}} = N \times 10^2 \times 10^{\text{разв}}$, где разв – степень разведения, а N- количество блюшек на чашке Петри.

2.2.27. Аффинное обогащение пептидных библиотек

Аффинное обогащение пептидных фаговых библиотек Ph.D-12 и Ph.D-C7C проводили как описано в инструкции производителя «Ph.D.TM Phage Display Libraries».

Антитело fh1A и контрольное рекомбинантное антитело ch14D5, специфичное к гликопротеину E вируса клещевого энцефалита [Вауков I.K., 2014], растворенные в 0,1 М NaHCO₃, pH 8.6 в концентрации от 100 до 10 мкг/л, сорбировали на поверхность полистироловых планшетов (Greiner, Германия) в течение ночи при комнатной температуре. Места неспецифического связывания блокировали 3% раствором сухого молока в ТБР, либо 3% раствором БСА в ТБР (в третьем раунде) в течение часа. После удаления блокирующего раствора планшеты промывали 6 раз раствором ТБР с 0,1% Tween-20. Затем в лунки с контрольным антителом вносили около 10^{11} БОЕ пептидной фаговой библиотеки и инкубировали 1 ч при 37°C, после чего не связавшиеся бактериофаги переносили в лунки с антителом fh1A и инкубировали 1 ч при 37°C. Не связавшиеся бактериофаги удаляли и промывали лунки планшета 10 раз ТБР с 0,1% Tween-20, а связавшиеся фаговые частицы элюировали раствором антитела в концентрации 100 мкг/мл в течение 30 минут при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Полученный элюат использовали для инфицирования клеток *E. coli* ER2738 в объеме 20 мл, находящихся в экспоненциальной фазе роста; небольшую аликвоту отбирали для титрования.

Инфицированные клетки инкубировали в течение 4,5 часов при 37°C, после чего выделяли фаговые частицы.

2.2.28. Выделение фаговых частиц, экспонирующих пептиды

Экспоненциальную культуру клеток *E.coli* ER2738 инфицировали бактериофагами и инкубировали в течение 4,5-5 часов при 37 °С при постоянном перемешивании. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 минут при 12000 g при 4°C. Супернатант с бактериофагами, не захватывая клеточный осадок, осторожно переносили в другие пробирки, добавляли 1/6 объёма PEG/NaCl и инкубировали при 4°C в течение 2 часов. Затем бактериофаги осаждали центрифугированием в течение 15 минут при 12000 g при 4 °С. После этого супернатант сливали, а осадок растворяли в 1 мл TBS и снова центрифугировали в течение 5 минут при 14000 g при 4 °С для удаления оставшихся клеток. Затем супернатант переносили в новые пробирки, добавляли 1/6 объёма PEG/NaCl и инкубировали во льду в течение часа. Бактериофаги осаждали центрифугированием при 14000 g в течение 10 минут при 4 °С. Супернатант удаляли, а осадок, содержащий фаговые частицы, растворяли в 50 мкл TBS.

2.2.29. Выделение ДНК бактериофагов, несущих пептид

Экспоненциальную культуру клеток *E. coli* ER2738 инфицировали бактериофагами и инкубировали в течение 4,5-5 часов при 37°C с качанием. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 минут при 12000 g при 4°C. К супернатанту добавляли 2/5 объема 20% PEG/2.5 mM NaCl и инкубировали в течение 20-30 минут при комнатной температуре. После чего бактериофаги осаждали центрифугированием при 12000g в течение 10 минут при 4°C. Осадок ресуспендировали в 200 мкл йодидного буфера, добавляли 500 мкл 96 % этанола и инкубировали 10-20 минут при комнатной температуре. Суспензию центрифугировали при 12000 g в течение 10 минут при 4°C. Супернатант удаляли и осадок промывали 70 % этанолом, спирт удаляли, осадок высушивали на воздухе, а затем растворяли в 30 мкл бидистиллированной воды.

2.2.30. Полимеразная цепная реакция с бляшек и определение нуклеотидной последовательности

В лунки ПЦР-планшета (Applied Biosystems) добавляли 20 мкл ФСБР. Выросшие за ночь на верхнем агаре бляшки переносили микробиологической петлей в лунки с ФСБР, прогревали при 96°C в течение 5 минут и использовали в качестве матрицы. Реакцию проводили в буфере Dream Taq Green, при этом один цикл состоял из: I стадия – денатурация матрицы - 94°C, 1 мин; II стадия – отжиг праймеров на матрице - 56°C, 30 сек; III стадия – реакция полимеризации - 72°C, 1 мин. Всего проводили 30 циклов ПЦР. Реакционная смесь объемом 30 мкл содержала по 10 пкм праймеров M13_pIII_F и M13_pIII_96, смесь dNTP (по 0,25 mM каждого), 3 мкл 10×Dream Taq Green буфера, 5 мкл раствора ДНК, 5 ед. акт. Таq-ДНК-полимеразы. Продукты амплификации анализировали в 2% агарозном геле.

Реакцию Сэнгера для определения нуклеотидной последовательности ДНК проводили с использованием праймера M13_pIII_96 как описано в п. 2.2.6.

2.2.31. Статистический анализ

Все эксперименты *in vitro* проводили в трех или более повторах.

Для статистической обработки данных использовали t-критерий Стьюдента. Значение $p \leq 0,005$ отражало статистически достоверные отличия. 95% доверительный интервал рассчитывали в программе MS Excel.

2.2.32. 3D-структуры белка p35 BOB

3D-структуры белка, кодируемого OPT H3L BOB, (PDB 5EJ0) с указанными предполагаемыми нейтрализующими эпитопами и сайтами связывания гликозаминогликанов (GAGbs). Молекулярные координаты для белка p35 BOB (PDB 5EJ0), используемого в структурном анализе, были получены из базы данных белков, а затем визуализированы с использованием 3D-Mol Viewer (компонент Vector NTI Suite 8.0). Трехмерная структура белка J3L BOK была предсказана с использованием сервиса онлайн-моделирования методом гомологичного выравнивания I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>).

Глава 3. Результаты

3.1. Отбор из комбинаторной иммунной библиотеки *scFv* антител, специфичных к вирусу экстромелии, и исследование их свойств

Аффинное обогащение иммунной библиотеки с использованием вируса экстромелии (ВЭ), штамм К-1 в качестве антигена проводили в ходе двух последовательных раундов аффинной селекции. При проведении первого и второго раундов аффинного обогащения ВЭ сорбировали в лунки иммунологических планшетов в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР) в концентрации 100 мкг/мл и 50 мкг/мл. Контролем служили лунки, содержащие ФСБР без антигена. При проведении каждого раунда селекции использовали 10^{11} - 10^{12} фаговых частиц, экспонирующих на своей поверхности одноцепочечные антитела, которые вносили в лунки с сорбированным антигеном после блокирования мест неспецифического связывания. Несвязавшиеся фаговые антитела удаляли после инкубации, а связавшиеся с антигеном – элюировали раствором 100 мМ триэтиламина. Полученным фаговым элюатом инфицировали культуру клеток *E.coli* TG1 в экспоненциальной фазе роста. Выросшие клетки собирали и использовали для наработки новой популяции бактериофагов и проведения следующего раунда аффинного обогащения библиотеки.

Особенностью процедуры биопэннинга является то, что в отобранной после раундов аффинной селекции фракции находятся не только фаговые антитела, специфичные к сорбированному антигену, но и фаговые антитела, отобранные на пластик планшета и блокирующий агент. Поэтому для контроля биопэннинга всякий раз параллельно проводили контрольный биопэннинг – отбор бактериофагов на пластик и агент для блокировки.

Для того чтобы исключить отбор фаговых антител на блокирующий агент, в первом и во втором раундах применяли различные агенты для блокирования неспецифического связывания: в первом раунде использовали 3% раствор БСА, во втором раунде – 3% раствор сухого молока. Соответственно, отрицательными контролями служило неспецифическое связывание фаговых антител с 3 % раствором БСА в первом раунде и с 3 % раствором сухого молока во втором раунде (Таблица 2).

Таблица 2 – Количество фаговых частиц в популяциях, полученных в результате проведения первого и второго раундов биопэннинга

Раунд	Количество отмывок / концентрация АГ	Блокирующий агент	Количество фаговых частиц (БОЕ/мл)	Количество элюированных фаговых частиц в образце / в контроле
1 раунд	10 / 100 мкг/мл	3% раствор БСА в ФСБТ	10^{11} - 10^{12}	$2,4 \times 10^6$ / $1,5 \times 10^5$
2 раунд	20 / 50 мкг/мл	3% раствор сухого молока в ФСБТ	10^{11} - 10^{12}	$1,2 \times 10^6$ / $8,0 \times 10^4$

Поликлональные популяции фаговых антител, полученные после каждого раунда биопэннинга, а также исходная фаговая библиотека были протестированы 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 обогащение ее фагами, экспонирующими на поверхности scFv антитела против ВЭ (Рисунок 4).

Из библиотеки, полученной в результате второго раунда биопэннинга, методом ИФА было протестировано 96 клонов по способности продуцировать scFv антитела, специфически взаимодействующие с ВЭ. На пластиковые планшеты сорбировали суспензию ВЭ в ФСБР в концентрации 3 мкг/мл. Раствор БСА в ФСБР использовали в качестве отрицательного контроля, бактериофаг M13K07, не несущий антител на своей поверхности, – в качестве контроля неспецифического связывания. Критерием отбора клонов методом ИФА являлось превышение оптической плотности исследуемого scFv антитела над соответствующим значением в отрицательном контроле более чем в 5 раз. В результате было отобрано 12 положительных клонов, специфически связывающих ВЭ, что составило 12,5 % (Рисунок 5).

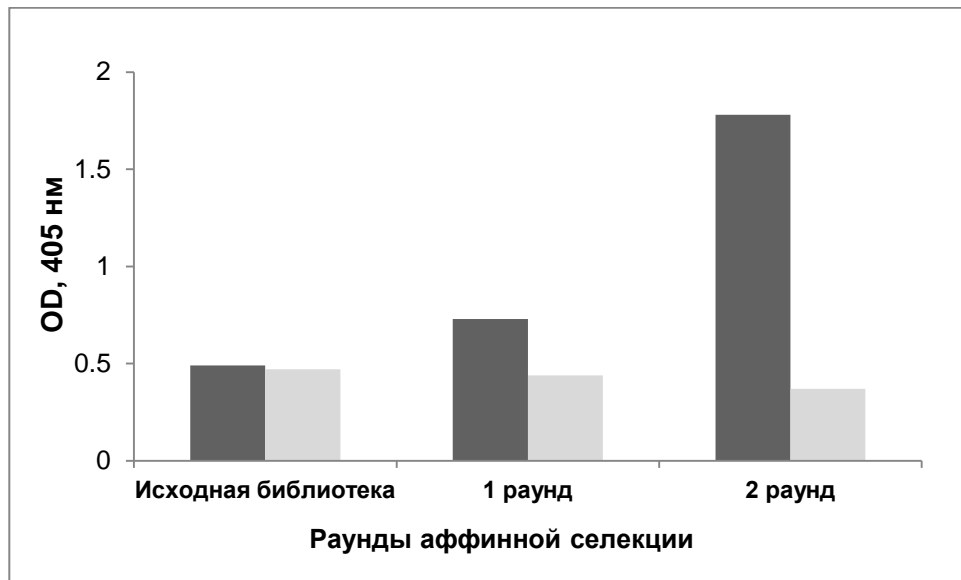


Рисунок 4 – Иммуноферментный анализ связывания популяций фаговых антител с ВЭ (темные столбики) и блокирующим агентом (светлые столбики). Титр популяций фаговых АТ – 10^{12} БОЕ/мл

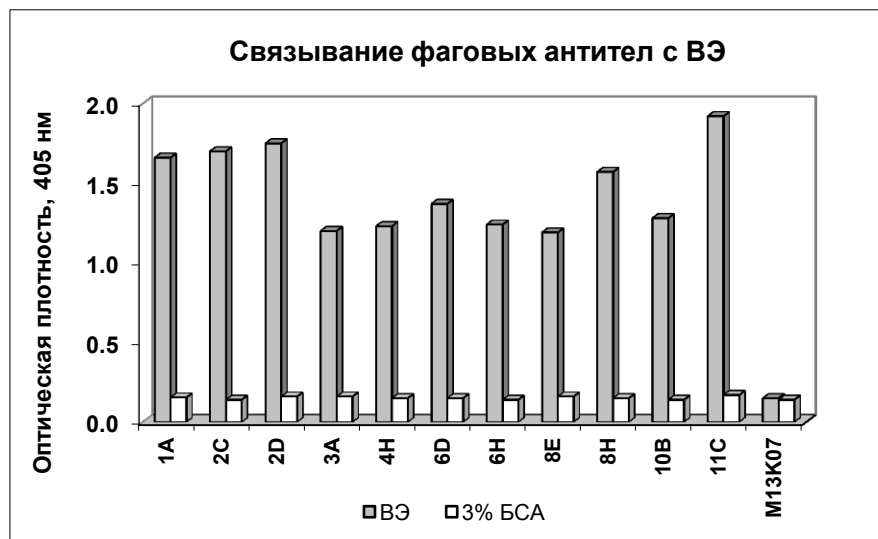


Рисунок 5 – Иммуноферментный анализ связывания отобранных фаговых антител с ВЭ

3.2. Определение нуклеотидной последовательности генов, кодирующих отобранные одноцепочечные антитела

Часто при проведении скринингов обогащенных библиотек отбираются доминантные клоны; антитела, которые они несут на своей поверхности, могут быть идентичными по своей аминокислотной последовательности. Для определения аминокислотных последовательностей отобранных scFv антител были секвенированы

последовательности кодирующих их генов. Полученные нуклеотидные и соответствующие аминокислотные последовательности анализировали с использованием баз данных IgBLAST [Altschul et al., 1997]. 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 (Рисунок 6), а так же определить семейства V-генов, к которым они принадлежат (Таблица 3). При анализе аминокислотных последовательностей антител, было показано, что последовательности одноцепочечных антител 1A/2C/2D/3A/11C совпадают. Идентичными оказались последовательности одноцепочечных антител 4H и 6D, а также 6H и 10B. В результате было выявлено 6 уникальных антител: 1A, 4H, 6H, 8H, 8E и 8C.

	←-----FR1----->	CDR1	←-----FR2----->			
1A	MAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFD	DYAMH	WVRQAPGKGLEWVSGISWNS	GSI	[60]	} V_H
4HR.....F.	[60]	
6HR.....	[60]	
8HR.....	[60]	
8ER.....F.	[60]	
	CDR2	←-----FR3----->	CDR3	←-FR4-->		
1A	GYADSVKGG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK	GSIAALRRHAFDI	WGQGTMTV TV	[122]	} V_H
4H	DR...-..G...	[122]	
6H	A.....	...T.....D.....	DR...-..G...	[122]	
8H	A.....	DR...-..G...	[122]	
8E	A.....	L.....	DG...-..GY..Y	[122]	
	линкер	←-----FR1----->	CDR1	←-		
1A	SSGGGSGGGGSAPGSGGGGS	EIVLTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQSISSYLNW	YQ	[180]	} V_L
4H	P...-..A.....	D.QM.....	[180]	
6H	...-..GS..AAVHRV.....	D.QM.....	[180]	
8H	...-AV.....	[180]	
8E	D.QM.....	...G..N..A..	..	[180]	
	----FR2---->	CDR2	←-----FR3----->	CDR3		
1A	QKPGKAPKLLIY	AASSLQSS	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QQSYSTLRT	[240]	} V_L
4HN.....PL.	[240]	
6H	[240]	
8HPSS	[240]	
8E	.R...V..P...	...T...PY.	[240]	
	←---FR4--->	6×His Tag				
1A	FGQGTKVEIKRAAANNHHHH	[260]				
4H	..G...D.....	[260]				
6HL.....	[260]				
8HD.....	[260]				
8EL.....	[260]				

Рисунок 6 – Выведенные аминокислотные последовательности V_H и V_L доменов scFv антител, отобранных против ВЭ. FR – каркасные регионы тяжелых и легких цепей. CDR – гипервариабельные участки.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело 8С, содержала множество супрессорных стоп-кодонов в любой рамке считывания. При анализе последовательности с использованием баз данных IgBLAST было обнаружено 2 однонуклеотидных делеции.

В результате анализа были идентифицированы пять различных scFv, которые отличались друг от друга, по меньшей мере, на 13 ака (Рисунок 6). VH-домены всех отобранных scFv принадлежали к семейству иммуноглобулинов человека VH3-9 / D6-6, а VL-домены – к семейству KV1-39 (Таблица 3). Однако степень их гомологии с соответствующими зародышевыми линиями варьировала. Петли CDR3H отобранных scFv демонстрировали общий мотив: --**IAA-R--AFDI**.

Таблица 3 – 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

Поскольку CDR3-участки V_H доменов антител, отвечающие за связывание с антигенами, различались по нескольким ака, но имели общий мотив, было сделано предположение, что указанные антитела, по всей видимости, связывают один и тот же эпитоп.

Все последовательности V_L доменов анти-ВЭ антител различались между собой, однако принадлежат к одному и тому же 39-01 подсемейству V_{k1} семейства.

При этом CDR3-V_L антител схожи и различались только по трем ако. В CDR3-V_L можно выделить общий мотив QQSYST (Рисунок 6).

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

3.3. Исследование связывания отобранных анти-ВЭ антител с ортопоксвирусами

Отобранные антитела 1А, 4Н, 6Н, 8Н и 8Е протестировали в реакции перекрестного связывания с различными представителями ортопоксвирусов. Для этого 8 последовательных разведений ВОВ, ВОК и ВЭ сорбировали в лунки иммунологических планшетов с начальной концентрацией 6 мкг/мл (шаг разведения 1:4) и инкубировали с фаговыми антителами, нанесенными в равных концентрациях (10^{11} БОЕ/мл). Оказалось, что протестированные антитела 4Н, 6Н, 8Н, 1А, связывали различные ортопоксвирусы приблизительно с равной эффективностью и, следовательно, являлись группоспецифическими (Рисунок 7). Антитело 8Е несколько хуже связывало ВОВ и ВЭ, и совсем не взаимодействовало с ВОК. Возможно, это антитело направлено к видоспецифическому эпитопу, либо различия в аминокислотных последовательностях белков ортопоксвирусов, а также замены в самом антителе 8Е повлияли на эффективность связывания этого антитела.

3.4. 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. Для этого белки ВОВ, ВОК, ВНО и ВЭ, разделенные электрофоретически в полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали с различными фаговыми антителами. Инкубирование с фагом-помощником M13K07, не несущим scFv на своей поверхности, служило контролем неспецифического связывания. В результате проведенных экспериментов было показано, что все анти-ВЭ антитела связывали белок ВОК, ВОВ, ВНО и ВЭ массой около 35 кДа (Рисунок 8).

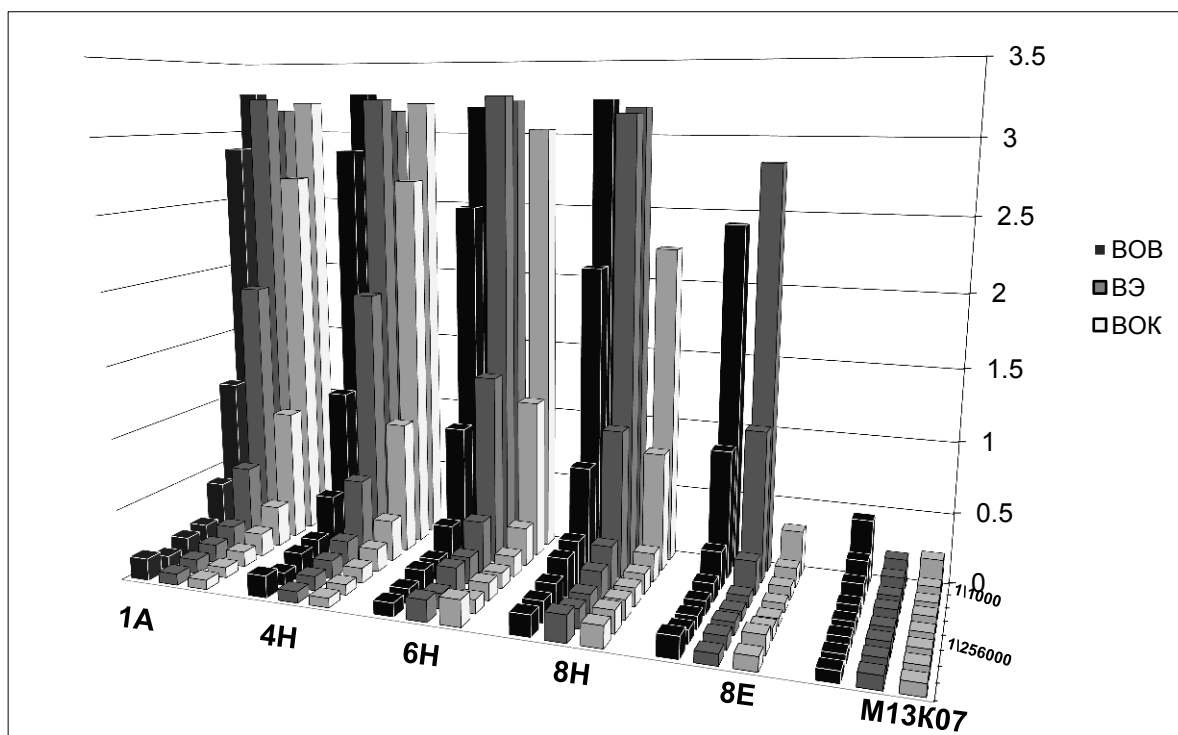
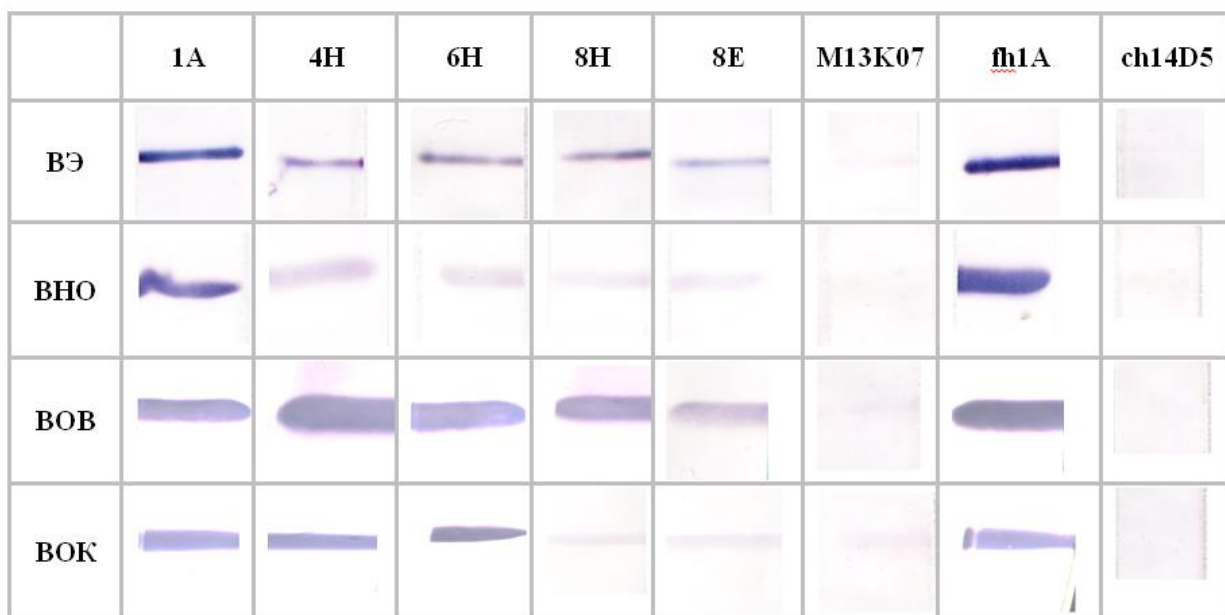
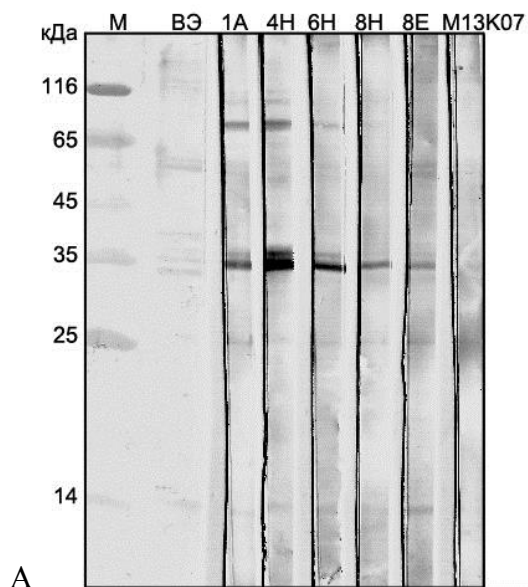


Рисунок 7 – Тестирование связывания фаговых антител, отобранных против ВЭ, с BOB, ВЭ и BOK с помощью ИФА (начальная концентрация вирусов 1 мкг/мл, шаг 1:4, концентрация фАТ 10^{11} БОЕ/мл)

Было сделано предположение, что белок с массой около 35 кДа, связываемый антителами, отобранными против ВЭ, соответствует основному иммунодоминантному белку ортопоксвирусов, кодируемому OPT N3L BOB, штамм Копенгаген, (OPT J3L BOK, штамм Гришак, OPT I3L BHO, штамм Ind3a, и OPT ECTV085 ВЭ, штамм Moscow). Данное предположение было проверено методом вестерн-блот анализа с химерным рекомбинантным белком p35-β-Gal. Ранее была сконструирована плазмида pUR-J3L [Дубровская и др., 2007], обеспечивающая экспрессию химерного рекомбинантного белка p35-β-Gal BOK, являющегося аналогом белка p35 BOB. Для этого в качестве экспрессирующего вектора использовали плазмиду pUR291, содержащую ген, кодирующий β-галактозидазу, к 3'-концу которого присоединяли фрагмент ДНК, кодирующий белок p35. Полученный рекомбинантный белок pJ3L экспонировал вируснейтрализующие эпитопы, что подтверждалось его выявлением вируснейтрализующими антителами и сыворотками доноров, вакцинированных BOB, методом вестерн-блот анализа [Дубровская и др., 2007].



Б

Рисунок 8 – Вестерн-блот анализ связывания антител, отобранных против ВЭ, с ВЭ (А) и ВНО, ВОВ, ВОК (Б)

Антитела 1А, 4Н, 6Н, 8Н и 8Е, отобранные против ВЭ, связывали химерный рекомбинантный белок р35-β-Gal. В качестве отрицательного контроля использовали фаг-помощник М13К07, не несущий на своей поверхности антител. Кроме того, фаговые антитела, отобранные против ВЭ, и фаг М13К07 выявляли белковые полосы массой около 200, 30 и 14 кДа, в том числе и в лизатах клеток, несущих векторную плазмиду рUR291, не содержащую вставки гена, кодирующего белок р35. Вероятно, это можно объяснить неспецифическим связыванием фаговых частиц с белками *E.coli*. (Рисунок 9)

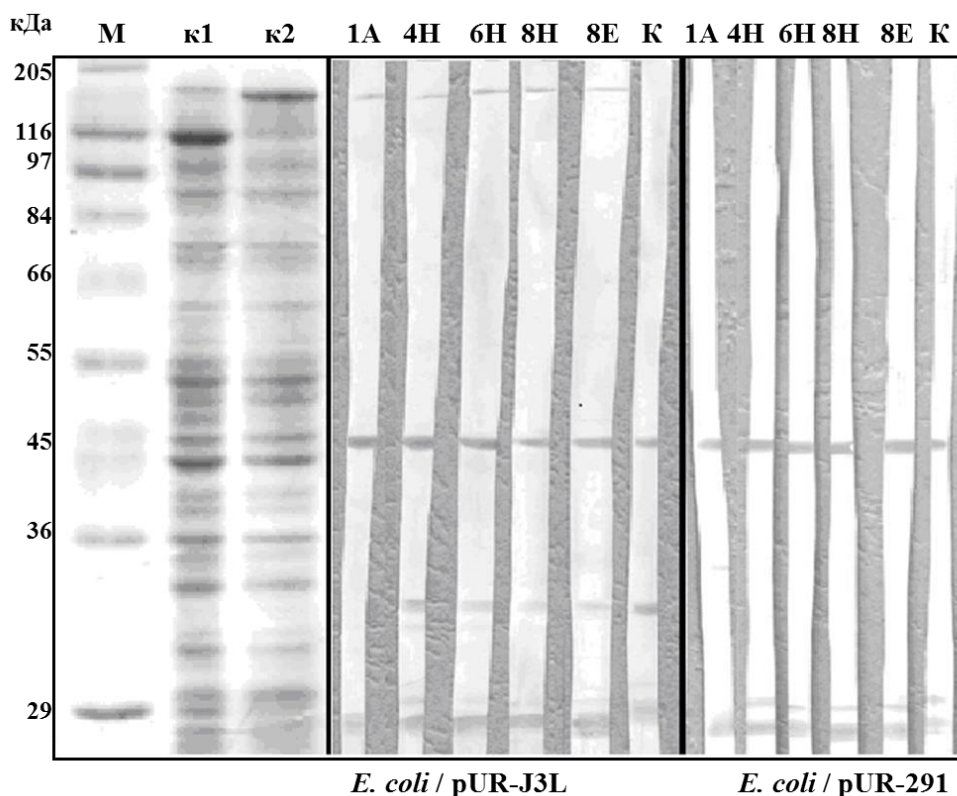


Рисунок 9 – Связывание антител, отобранных против вируса экстремелии, с лизатами клеток *E. coli*, трансформированных плазмидами pUR-J3L и pUR291. Белковые профили клеток *E. coli*, трансформированных плазмидами pUR-291 (κ1) и pUR-J3L (κ2), М – маркер молекулярных масс белков

Для визуализации прямого связывания фаговых антител с ортопоксвирусами использовали атомно-силовую микроскопию. Было показано, что фаговое антитело (Рисунок 10 А) связывало частицы ВОВ (Рисунок 10 Б). Бактериофаг М13К07, который не экспонирует scFv на своей поверхности, не связывался с частицами ВОВ (Рисунок 10 В). Более того, фаговые антитела взаимодействовали с ВОВ только своими апикальными концами, на которых экспонируются scFv. Этот факт, а также хаотичное расположение бактериофага дикого типа М13К07 (Рисунок 10 В) указывали на отсутствие неспецифических взаимодействий между основным капсидным белком р8 бактериофага и частицами ВОВ.

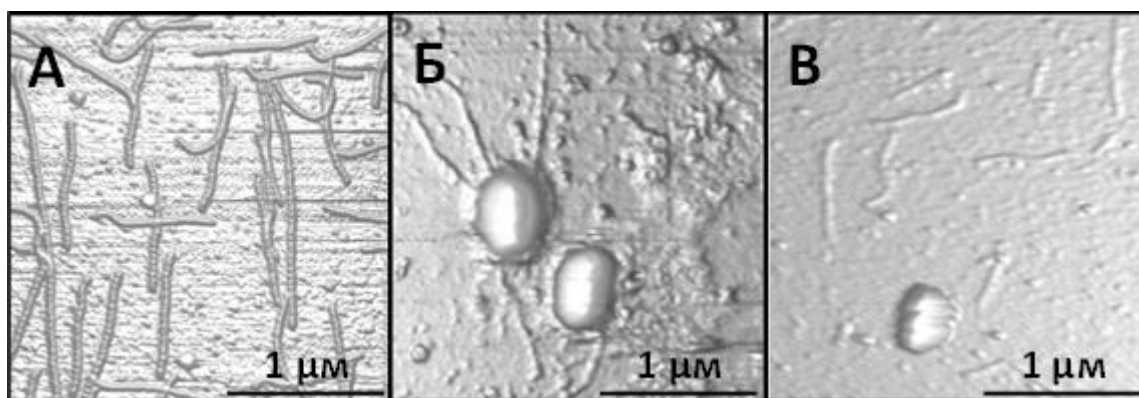


Рисунок 10 – Атомно-силовая микроскопия связывания фаговых антител и бактериофага М13К07 с ВОВ. Капли анализируемой суспензии фагового антитела 1А (А), фагового антитела 1А, смешанного с ВОВ (Б), и бактериофага М13К07, смешанного с ВОВ (В), были нанесены на предметное стекло и оставлены для адсорбции на поверхности. Изображения были получены в полуконтактном режиме в атмосферных условиях с использованием алмазоподобного углеродного кантилевера серии NSG с радиусом кривизны острия 1–3 нм. АСМ-изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения Nanoscope Analysis (Bruker, Германия). Масштабная линейка 1 мкм.

3.5. 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* Е6. В качестве контроля неспецифической нейтрализации использовали фаговое антитело anti-Thy, не взаимодействующее с ортопоксвирусами, что было подтверждено в предварительных экспериментах. Вируснейтрализующее МКА мыши 2D5 [Ichihashi и Oie, 1996] использовали в качестве положительного контроля. Исследование проводили при постоянном титре ортопоксвирусов, который составлял около 200 БОЕ/мл для ВНО, и при различных разведениях фаговых антител, начальная концентрация которых составляла 8×10^{12} БОЕ/мл, с шагом разведения 1:4.

Тестирование вируснейтрализующей активности показало, что фаговые антитела 1А, 4Н и 6Н, отобранные по способности связывать ВЭ, обладали вируснейтрализующей активностью и в отношении патогенного для человека ВНО. Уровень нейтрализации антителами 8Н и 8Е составил 48 и 45 %, соответственно. Результаты представлены на рисунке 11. Титры фаговых антител 4Н, 6Н и 1А, при

которых наблюдалась нейтрализация бляшкообразования ВНО, т.е. уменьшение количества бляшек не менее чем на 50%, составили 2×10^{12} БОЕ/мл.

Кроме того, была проверена вируснейтрализующая активность по отношению к ВНО фаговых антител, отобранных ранее против ВОВ (b9, a4, d2, e7 и e8) [Дубровская и Тикунова, 2007] и ВОК (3VA10) [Патент RU2005125994]. Результаты показали, что фаговые антитела b9, a4, e7 и e8, отобранные по способности связывать ВОК, и 3VA10, отобранные против ВОВ, обладали вируснейтрализующей активностью и в отношении патогенного для человека ВНО (Рисунок 11). Фаговые антитела b9, a4, d2, e7 и 3VA10 подавляли бляшкообразование ВОО на культуре клеток (Таблица 4). 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.

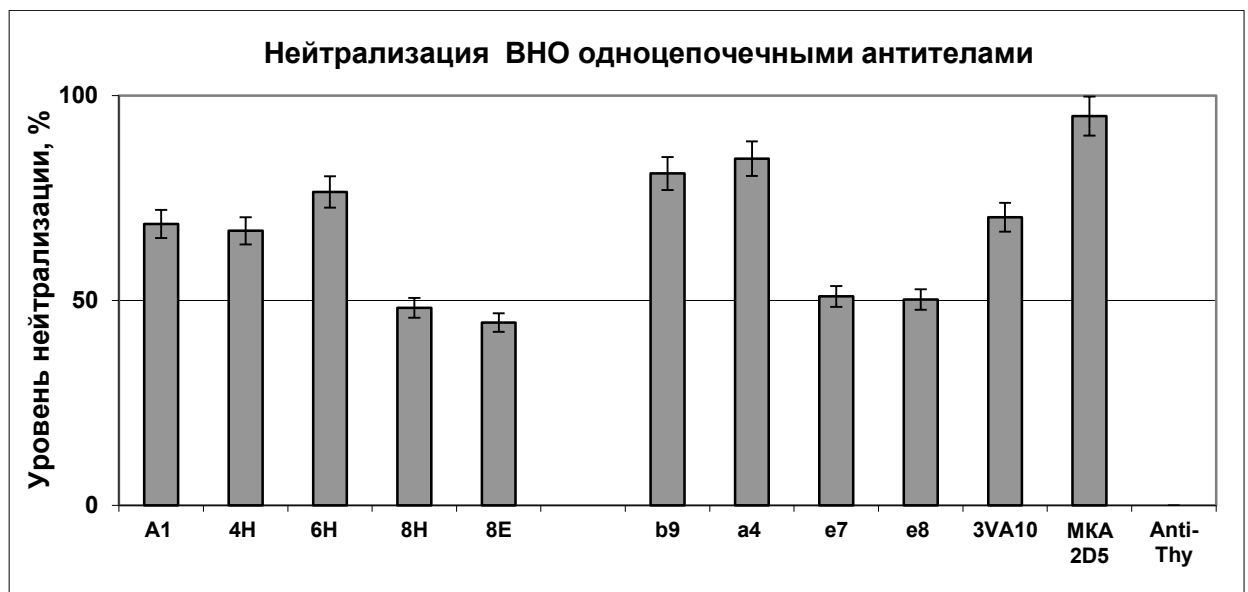


Рисунок 11 – Нейтрализация ВНО фаговыми одноцепочечными антителами в культуре клеток *Vero E6*. Титр фаговых антител – 10^{13} БОЕ/мл, титр ВНО – 200 БОЕ/мл

Таблица 4 – Вируснейтрализующая активность одноцепочечных антител человека против ортопоксвирусов

Антитело	Вирус натуральной оспы	Вирус осповакцины	Вирус оспы коров	Вирус оспы обезьян	Вирус экстремелии
b9	+	+	+	+	+
a4	+	+	+	+	+
d2	н/о	+	+	+	+
e7	+	+	+	+	+
e8	+	+	+	н/о	+
3VA10	+	+	+	+	+
g4	-	+	-	-	-
anti-Thy	-	-	-	-	-

Исследование дозозависимой активности в реакции нейтрализации ВОО, ВОК, ВОВ и ВНО в культуре эукариотических клеток *Vero* Е6 проводили для антител 1А и b9 (Рисунок 12). В качестве контроля неспецифической нейтрализации использовали фаговое антитело anti-Thy [Ewert et al., 2003]. 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. 50% уровень нейтрализации ВОВ и ВОК наблюдали при добавлении $\sim 6,3 \times 10^{11}$ БОЕ/мл фаговых антител, ВНО – $\sim 2,5 \times 10^{12}$ БОЕ/мл. Подавление бляшкообразования ВОО антителом 1А происходило при добавлении $\sim 10^{13}$ БОЕ/мл, а антителом b9 – $\sim 2,5 \times 10^{12}$ БОЕ/мл.

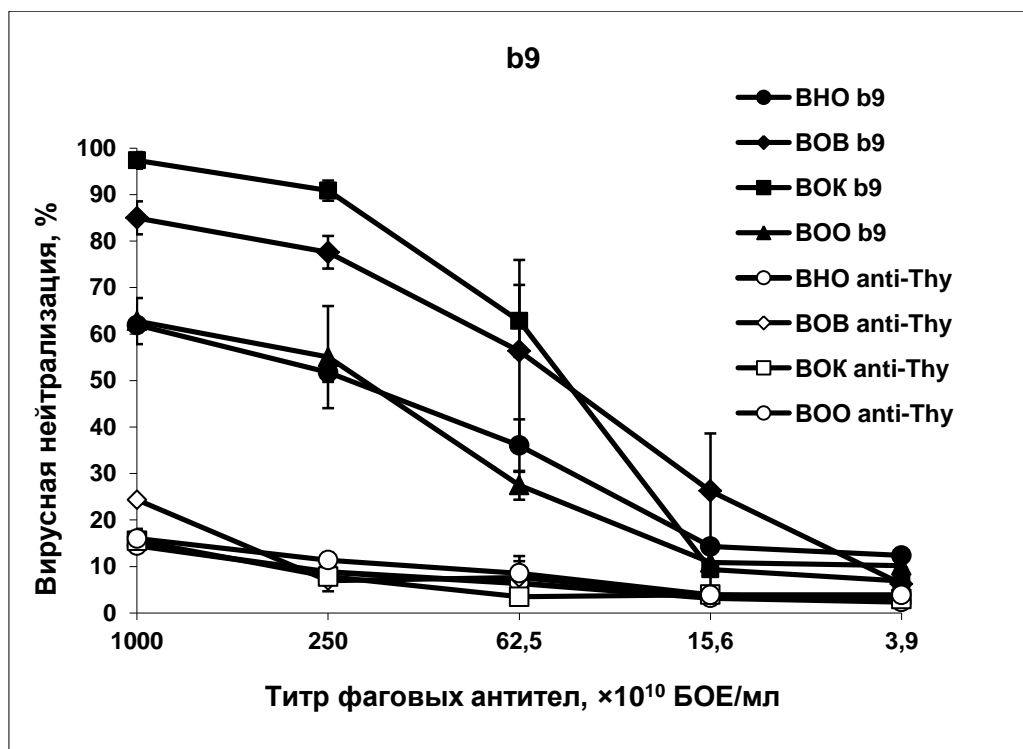
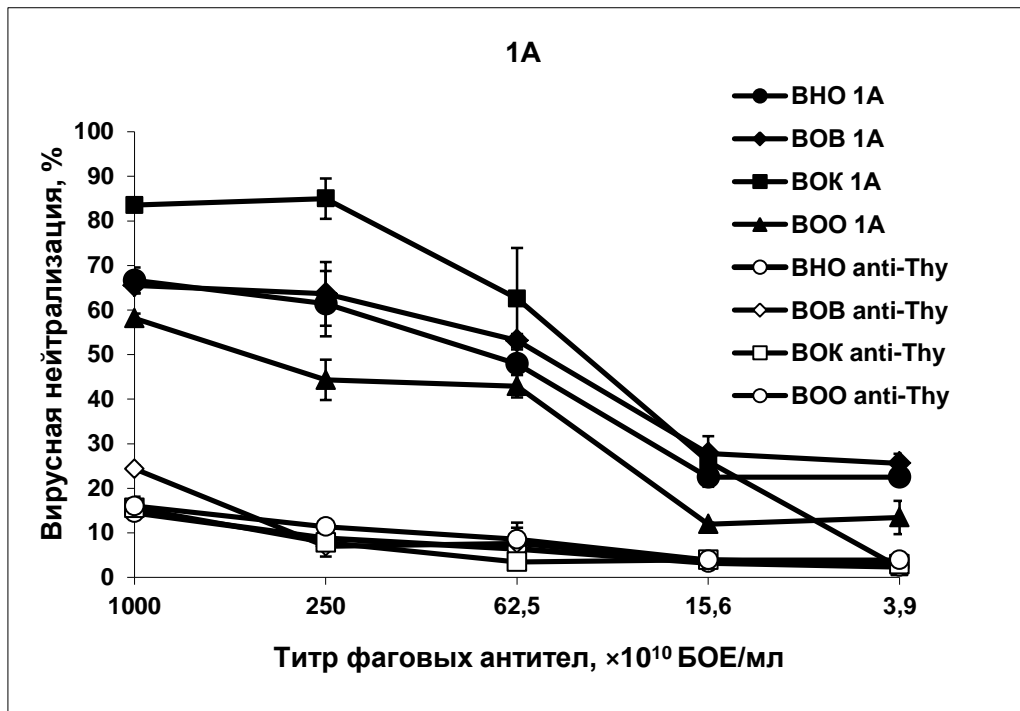


Рисунок 12 – Нейтрализация ортопоксвирусов фаговыми одноцепочечными антителами 1A (A) и b9 (Б) и контрольным антителом anti-Thy в культуре клеток *Vero E6*. Титр ВНО – 200 БОЕ/мл, ВОК – 320 БОЕ/мл, ВОО и ВОВ – 250 БОЕ/мл

3.6. Определение нуклеотидной последовательности ОРТ EVM085, кодирующей белок р35 ВЭ (штамм К1)

Последовательность ОРТ EVM085, кодирующей белок р35, ВЭ, штамм К1, против которого были отобраны вируснейтрализующие антитела, к началу проведения исследования не была определена. Для ее определения праймеры подбирали с использованием последовательности ОРТ, кодирующей данный белок, опубликованной для ВЭ, штамм Moscow. Длина ОРТ EVM085 составляла 972 п.н., поэтому было разработано 2 пары праймеров ect_085_1 / ect_085_back1 и ect_085_2 / ect_085_back2, позволяющих получить 2 ПЦР-продукта размером 614 и 717 п.н., соответствующих перекрывающимся областям гена. Расчетная температура отжига праймеров – 62 °С, фактическая – 56 °С. Последовательности праймеров приведены в таблице 1.

В качестве матрицы для ПЦР использовали суспензию вируса экстремелии (3мкг). Программа для амплификации: 1. 95°С – 1 мин – 1 цикл; 2. 95 °С – 10 сек, 58 °С – 10 сек, 72 °С – 1 мин – 36 циклов; 3. 72 °С – 1 мин.

В результате анализа секвеннограммы оказалось, что полученная нуклеотидная последовательность ОРТ, кодирующей белок р35 ВЭ, штамм К1, совпала с таковой для ВЭ штамма Moscow. Нуклеотидную последовательность депонировали в базу данных GenBank под номером HM236313.

3.7. Конструирование плазмид, кодирующих полноразмерные антитела человека против белка р35 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 [Юн и др., 2006], включая антитело fhb9, способное нейтрализовать инфекционность ортопоксвирусов. 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 антител, 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 гигромицину. Кроме того, были сконструированы экспрессионные плазмиды, несущие гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи антител 1A, 8E. Сконструированные экспрессионные плазмиды использовали для получения в эукариотических клетках полноразмерных антител человека fh1A, fh8E и fhb9.

Плазмиду для экспрессии гена тяжелой цепи антитела fh1A получали следующим образом. С помощью полимеразной цепной реакции был наработан ПЦР-фрагмент, кодирующий тяжелую цепь антитела. В качестве матрицы использовали плазмиду pHEN2-1A, содержащую ген, кодирующий тяжелую цепь антитела 1A. Амплификацию проводили с помощью праймеров VH_dir_XhoI и VH_rev_Acc65I, в которые были введены сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *XhoI* и *Acc65I*. В качестве вектора использовали плазмиду pCHm2 [Baikov et al., 2014] (Рисунок 13).

Векторную плазмиду pCHm2 и продукт амплификации, содержащий ген тяжелой цепи антитела 1A, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *XhoI* и *Acc65I*. Затем полученные гидролизаты разделяли электрофоретически в 0,8% агарозном геле, после чего фрагменты нужной длины элюировали из геля. Обработанный указанными эндонуклеазами рестрикции фрагмент ДНК, кодирующий тяжелую цепь антитела 1A, и плазмидную ДНК вектора объединяли в реакции лигирования с помощью ДНК-лигазы фага T4. Далее лигазную смесь использовали для трансформации клеток *E.coli*, штамм XL1Blue. Наличие встройки фрагмента гена в плазмидных ДНК, подтверждали с помощью ПЦР. После отбора клонов, содержащих VH-вставку, и выделения плазмидной ДНК из этих клонов, определяли нуклеотидные последовательности двух плазмид секвенированием с праймеров T7mod_dir и BGH_rev. Плазмиду для экспрессии гена тяжелой цепи антитела fh8E получали сходным образом. В результате были получены плазмиды pCHm2-1A и pCHm2-8E.

Для получения плазмиды, кодирующей лёгкую цепь полноразмерного антитела fh1A, поступали сходным образом. Для начала в фрагмент VL_1A кодирующий легкую цепь антитела, ввели сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *EcoRV* и

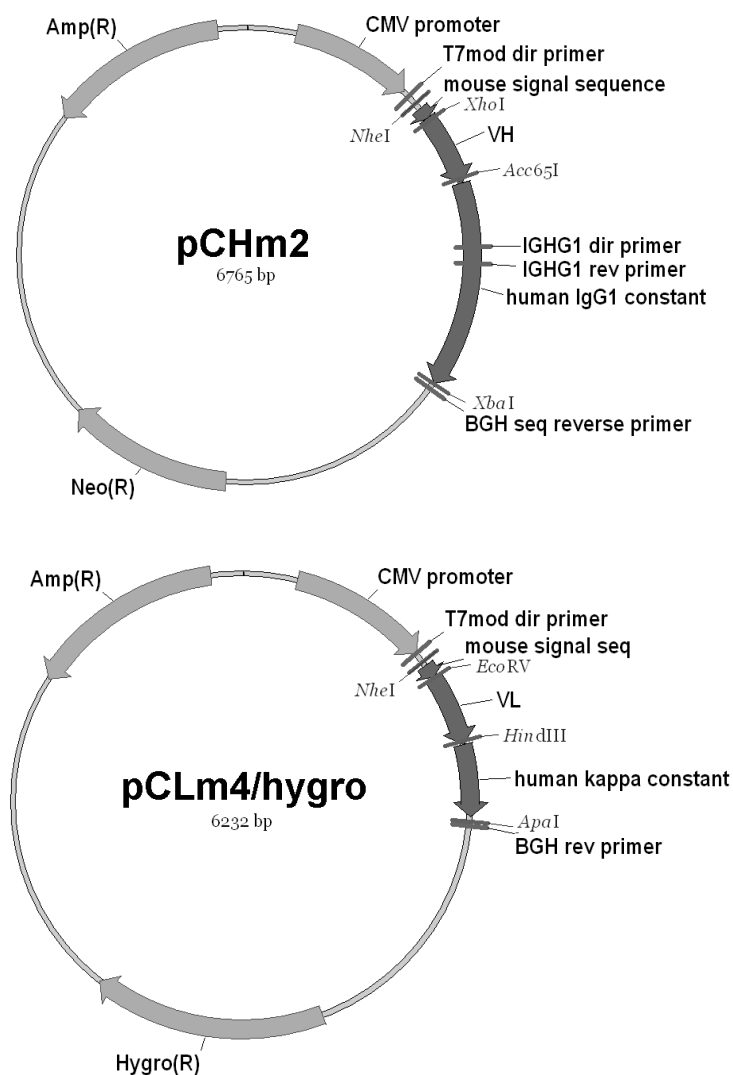


Рисунок 13 – Карты плазмид pCHm2 и pCLm4/hygro. Использованные обозначения: CMV promoter – цитомегаловирусный промотор; VH – участок гена, кодирующий переменный домен тяжелой цепи антитела; human IgG1 constant – участок, кодирующий константные домены тяжелых цепей антител человека изотипа IgG1; VL – участок гена, кодирующий переменный домен легкой цепи антитела; human kappa constant -- участок, кодирующий константный домен каппа-цепей антител человека; Neo(R), Amp(R) и HygroB(R) – гены, обуславливающие устойчивость к неомицину, ампициллину, и гигромицину Б, соответственно; mouse signal sequence – участок, кодирующий сигнальный пептид цепей иммуноглобулинов. Курсивом указаны сайты эндонуклеаз рестрикции

*Hind*III в результате ПЦР с использованием праймеров VL_dir_EcoRV и VL_rev_HindIII. Затем соответствующими эндонуклеазами гидролизовали полученный фрагмент и векторную плазмиду pCLm4/hygro. После очистки необходимые фрагменты объединяли в реакции лигирования с помощью ДНК-

лигазы фага T4. Далее лигазную смесь использовали для трансформации клеток *E.coli*, штамм XL1Blue. Наличие встройки фрагмента гена в плазмидных ДНК, подтверждали с помощью ПЦР. После отбора клонов, содержащих VL-вставку, и выделения плазмидной ДНК из этих клонов подтверждали отсутствие артефактов встраивания секвенированием полученных плазмид pCLm4/hygro-1A с праймерных олигонуклеотидов T7mod_dir и BGH_rev. Аналогичным образом получали плазмиды pCLm4/hygro-8E и pCLm4/hygro-b9 для экспрессии генов легких цепей антител fh8E и fhb9.

Полученные плазмиды выделяли с использованием набора “PureYield plasmid midiprep system” (Promega, США), позволяющего избавиться от эндотоксинов и некоторых других примесей, которые мешают трансфекции эукариотических клеток.

Таким образом, на основе модифицированных векторных плазмид были получены пять плазмидных ДНК: pCHm2-1A, pCHm2-8E, pCLm4/hygro-1A, pCLm4/hygro-8E и pCLm4/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 [Юн и др., 2006].

3.8. Получение полноразмерных антител в эукариотических клетках линии CHO-K1

Пары плазмид, pCHm2-1A и pCLm4/hygro-1A, pCHm2-8E и pCLm4/hygro-8E, а также pCHb9 и pCLm4/hygro-b9, были использованы для продукции полноразмерных человеческих антител в клетках CHO-K1, которые представляют собой клетки яичников китайского хомячка. Клетки линии CHO-K1 аттестованы для получения терапевтических препаратов в нашей стране.

Для получения полноразмерного антитела fh1A производили одновременную трансфекцию клеток CHO-K1 смесью, содержащей равные количества плазмид pCHm2-1A и pCLm4/hygro-1A. Трансфекцию проводили с помощью препарата Lipofectamin 2000 (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Концентрация клеток на лунку составила $1,5 \times 10^6$ (90% монослая). Эффективность трансфекции контролировали в дополнительном эксперименте, в котором была использована плаزمида pEGFP-N1 (Clontech, США), выделенная и очищенная аналогичным образом с использованием набора PureYield. Уровень трансфекции в

контрольном эксперименте оценивали по доле клеток, экспрессирующих зелёный флуоресцентный белок и излучающих свет в зелёной области спектра при облучении мягким ультрафиолетом.

Культуральную жидкость, содержащую антитело fh1A, отбирали через 48, 72, 96 и 144 ч. Полученную культуральную жидкость тестировали в вестерн-дот анализе на наличие антител и с помощью ИФА по связыванию с ВОВ. В качестве отрицательного контроля использовали культуральную среду клеток, содержащих плазмиду pEGFP-N1 и не экспрессирующих антител. Антитела проявляли конъюгатом щелочной фосфатазы с антителами мыши против IgG1-цепей человека (Рисунок 14). Анализ показал, в культуральную среду секретировались функционально активные антитела. При этом уровень продукции антител остаётся значительным даже на седьмые сутки после трансфекции.

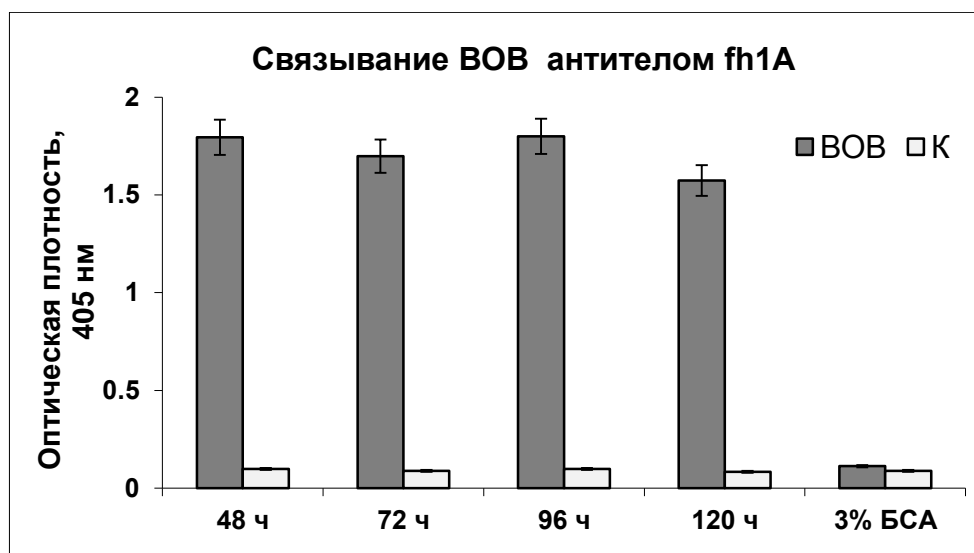


Рисунок 14 – Связывание ВОВ культуральной жидкостью, содержащей полноразмерное антитело fh1A. К – отрицательный контроль – культуральная среда клеток, содержащих плазмиду pEGFP-N1 и не экспрессирующих антител.

На следующем этапе был получен препарат очищенного антитела fh1A. Для этого порции культуральной среды, содержащие антитело, объединяли и проводили очистку от сопутствующих белков на сорбенте с ковалентно иммобилизованным белком А (protein A sepharose CL-4B, GE healthcare, США). Электрофоретический анализ очищенного препарата антитела, обработанного дитиотреитолом, выявил высокую степень чистоты и гомогенности препарата, а анализ антитела с

неповреждёнными дисульфидными связями подтвердил, что легкие и тяжёлые цепи должным образом объединены в молекулу иммуноглобулина, а отдельные цепи отсутствуют (Рисунок 15). После измерения концентрации и количества полученного антитела был определён выход, который составил около 1 мг белка с литра культуральной среды.

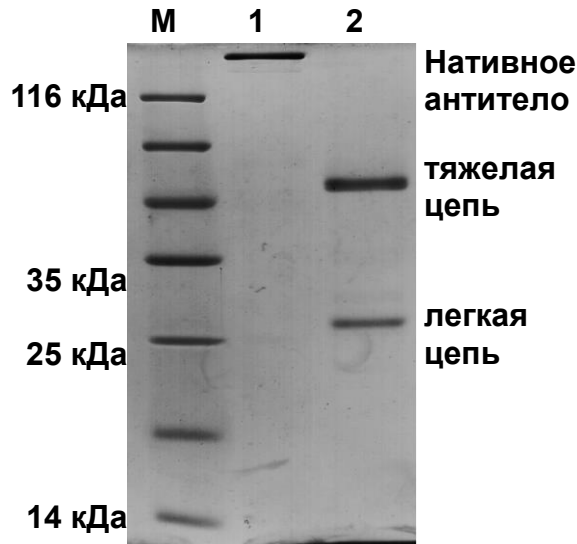


Рисунок 15 – Электрофореграмма в 15% ПААГ антитела fh1A с нативными (1) и разрушенными (2) дисульфидными связями. М – маркер молекулярных масс

Аналогичным образом были получены антитела fhb9 и fh8E. Дот-анализ с использованием антител, направленных против константных доменов антител IgG1 человека, выявил наличие в культуральной среде полноразмерных антител или, по крайней мере, их тяжёлых цепей.

Антитело fh1A, как и родительское фаговое антитело 1A, выявляло белок p35 различных ортопоксвирусов в вестерн-блот анализе (Рисунок 8 Б). В качестве контроля использовали химерное антитело ch14D5, направленное к гликопротеину E вируса клещевого энцефалита [Baikov et al., 2014].

Для антитела fhb9 проводили исследование дозозависимой активности в реакции нейтрализации ВОВ в культуре эукариотических клеток *Vero E6* (Рисунок 16). Концентрация антитела fhb9, при которой наблюдалась нейтрализация бляшкообразования ортопоксвирусов, т.е. уменьшение количества бляшек не менее чем на 50%, составил 15 мкг/мл.

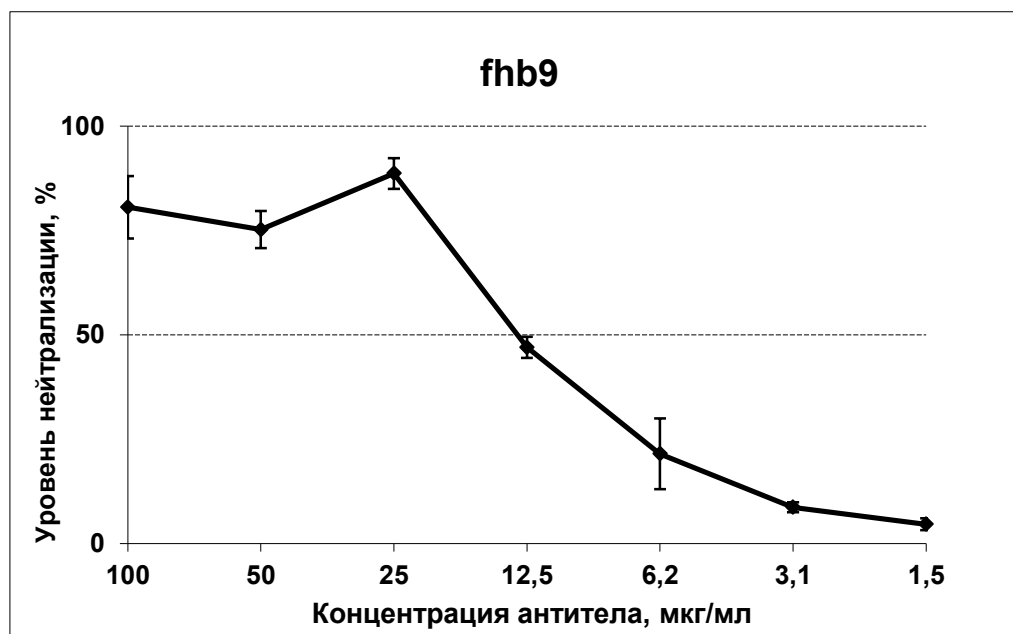


Рисунок 16 – Нейтрализация BOB антителом человека fhb9 в культуре клеток *Vero* Е6. Титр BOB – 320 БОЕ/мл.

3.9. 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. Ранее в нашей лаборатории была сконструирована кассетная плазида pCDNA5/FRT-DHFR-CH-CL, содержащая сайт гомологичной рекомбинации FRT, и гены, кодирующие константные домены тяжелой и легкой цепей полноразмерного антитела человека класса IgG1/ kappa, а также сайты эндонуклеаз рестрикции для встраивания фрагментов ДНК, кодирующих необходимые переменные домены тяжелых и легких цепей. Кроме того эта плазида содержит ген гигромицин фосфотрансферазы, обеспечивающий устойчивость к гигромицину Б, без стартового кодона ATG (Рисунок 17).

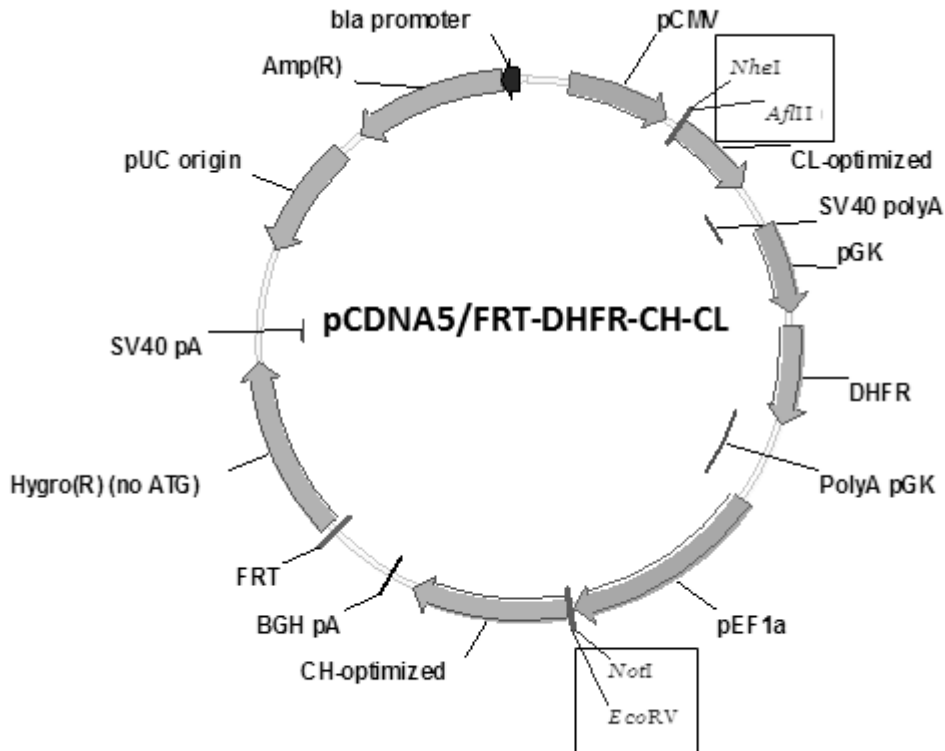


Рисунок 17 – Генетическая карта плазмиды pCDNA5/FRT-DHFR-CH-CL (9352 п.н.).
Использованные обозначения: pCMV – цитомегаловирусный промотор; pGK – промотор фосфоглицераткиназы; pEF1a – промотор фактора элонгации 1-альфа; CL – участок гена, кодирующий константный домен каппа-цепей антител; CH – участок, кодирующий константный домен тяжёлых цепей антител человека изоформа IgG1; DHFR – ген дигидрофолатредуктазы; BGH pA – сайт полиаденилирования бычьего гормона роста; FRT – FRT-сайт для гомологичной рекомбинации; bla promoter – промотор β-лактамазы; Amp(R) и Hygro(R) – гены, обуславливающие устойчивость к ампициллину и гиромоцину Б, соответственно. Курсивом указаны сайты эндонуклеаз рестрикции

С помощью полимеразной цепной реакции были наработаны ПЦР-фрагменты, кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела 1A. В качестве матрицы использовали плазмиду pCHm2-1A, содержащую ген, кодирующий тяжелую цепь антитела 1A, и плазмиду pCLm4/hygro-1A, содержащую ген, кодирующий легкую цепь антитела 1A. Амплификацию тяжелой цепи проводили с помощью праймеров VH_dir_NotI и VH_rev_EcoRV, в которые были введены сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции NotI и EcoRV. Сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции NheI и AflIII вводили в фрагмент, кодирующий легкую цепь, с помощью амплификации с использованием праймеров VL_dir_NheI и VL_rev_AflIII.

Векторную плазмиду pCDNA5/FRT-DHFR-CH-CL и продукт амплификации, содержащий ген тяжелой цепи антитела 1A, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NotI* и *EcoRV*. Полученные гидролизаты разделяли электрофоретически в 0,8% агарозном геле, фрагменты нужной длины элюировали из геля, и затем объединяли в реакции лигирования с помощью ДНК-лигазы фага T4. Далее лигазную смесь использовали для трансформации клеток *E.coli*, штамм XL1Blue. Наличие встройки фрагмента гена в плазмидных ДНК, подтверждали с помощью ПЦР. После отбора клонов, содержащих VH-вставку, корректность встроенной нуклеотидной последовательности подтверждали секвенированием с использованием праймеров T7mod_dir и BGH_rev. Затем полученную плазмиду и фрагмент, кодирующий переменный домен гена легкой цепи антитела 1A, гидролизовали эндонуклеазами рестрикции *NheI* и *AflIII*. Гидролизаты разделяли электрофоретически, элюировали из геля, и после объединения в реакции лигирования ДНК-лигазой фага T4 трансформировали клетки *E.coli*, штамм XL1Blue. Наличие встройки фрагмента гена в плазмидных ДНК также подтверждали с помощью ПЦР, корректность встроенной нуклеотидной последовательности проверяли секвенированием с использованием праймеров T7mod_dir и BGH_rev. Плазмиду для экспрессии антитела fh8E получали сходным образом. В результате были сконструированы плазмиды pCDNA5/FRT-DHFR-full_1A и pCDNA5/FRT-DHFR-full_8E.

F1p-рекомбиназы дрожжей, также называемые флиппазами, – это ферменты, для сайт-специфической рекомбинации. Они катализируют гомологичную направленную рекомбинацию с высокой частотой, если в донорной плазмидной ДНК и реципиентной геномной ДНК есть FRT-сайты для рекомбинации [Wilson et al., 2001]. Использование сайт-специфической рекомбинации является одним из подходов к получению продуктивного штамма-производителя.

Ранее в нашей лаборатории была получена 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. При трансфекции клеток использовали различные массовые соотношения плазмид pOG44 и pCDNA5/FRT-DHFR-full_1A: 19:1, 14:1, 9:1 и 4:1. Создание стабильного штамма-производителя полноразмерного

антитела человека fh8E делали аналогично и использовали плазмиду pCDNA5/FRT-DHFR-full_8E.

При встраивании в геном плазмиды, содержащей FRT-сайт, нарушается экспрессия слитого белка GFP-Zeo, поскольку FRT-сайт в геноме клеточной линии CHO-S/FRT расположен между стартовым кодоном ATG и слитым белком GFP-Zeo, но при этом появляется устойчивость к гигромицину Б. Клеточные линии, в геноме которых произошла сайт-направленная рекомбинация по FRT-сайту, становятся чувствительны к зеоцину, у них прекращается продукция зеленого флуоресцентного белка (GFP) и появляется устойчивость к гигромицину Б. Следовательно, стабильные трансформанты, продуцирующие рекомбинантные антитела, могут быть отобраны по чувствительности к зеоцину, по отсутствию флуоресценции в зеленой области спектра и устойчивости к гигромицину Б.

Флуоресценцию трансфицированных клеток анализировали с помощью проточного цитофлуориметра Novocyte 3000 (ACEA Biosciences, США), сравнивая уровень флуоресценции трансфицированных клеток и исходных нетрансфицированных клеток (Рисунок 18). Количество клеток без флуоресценции в зеленой области спектра варьировалось от 6 % (соотношение плазмид pOG44 и pCDNA5/FRT-DHFR-full_8E, либо pCDNA5/FRT-DHFR-full_1A было 4:1) до 60 % (соотношение 14:1).

Пулы трансформированных клеток, содержащие наименьшее число клеток, экспрессирующих GFP, использовали для дальнейшей селекции. Для этого клетки высевали на селективную среду (CD OptiCHO, 4 mM глутамин, 100 мкг/мл гигромицин Б). Селективную среду меняли каждые 3 - 4 дня. При достижении жизнеспособности в 90%, клетки повторно анализировали с помощью проточного цитофлуориметра. Поликлональные клеточные линии, в которых отсутствовала экспрессия GFP, клонировали в 96-луночной планшете методом предельных разведений в среде для клонирования (CD FortiCHO, 4 mM GlutaMAX, 100 мкг/мл гигромицин Б). Аликвоты, содержащие клетки отобранных клонов, замораживали, а оставшиеся части культивировали в течение 21 дня в селективной среде со 100 мкг/мл селективного антибиотика зеоцина для подтверждения точности гомологичной рекомбинации. Селективную среду меняли каждые 6 - 7 дней. При

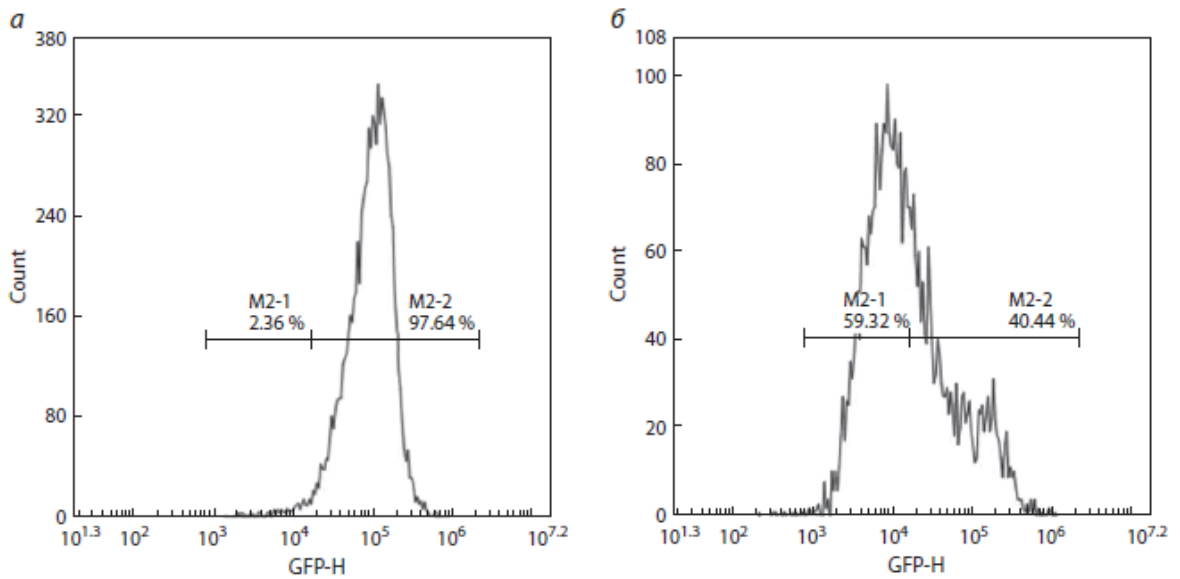


Рисунок 18 – Анализ изменения флуоресценции клеток CHO-S/FRT по уровню GFP, выполненный методом проточной цитофлуориметрии: *а* – пул исходных нетрансфицированных клеток CHO-S/FRT; *б* – пул клеток CHO-S/FRT, трансфицированных плазмидами pOG44 и pCDNA5/FRT-DHFR-full_8E в соотношении 14:1, через 48 ч после трансфекции

обнаружении клонов, чувствительных к зеоцину, клетки из соответствующих пробирок размораживали и высевали в питательную среду с метотрексатом для увеличения копийности генов из плазмидной ДНК в геноме клеток-продукентов.

Клетки, секретирующие антитело fh1A либо fh8E, высевали в концентрации 5×10^5 кл/мл в селективной среде, содержащей 200, 400, 800 или 1600 нМ метотрексата (MTX) (TEVA, Израиль). Селективную среду с метотрексатом меняли каждые 3 - 4 дня. После культивирования оценивали продуктивность у полученных пулов клеток с использованием ИФА. Продуктивность составила (мг/л):

	Исходный	200 нМ	400 нМ	800 нМ	1600 нМ
	пул клеток	MTX	MTX	MTX	MTX
fh8E	6.2	5.3	9.6	15.2	11.3
fh1A	10	11,2	13,1	21,2	8,4

Одно из главных требований при создании штамма-продукента – 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 (Рисунок 19), а также

тестировали способность антител выявлять ортопоксвирусный белок р35 с помощью вестерн-блот анализа (Рисунок 19, в, г).

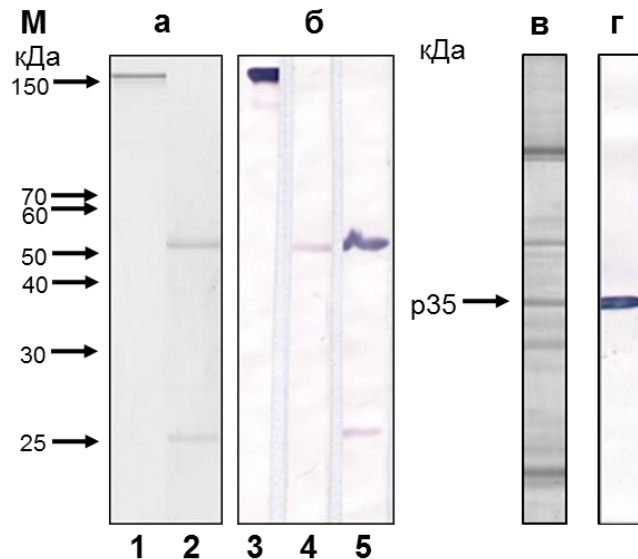


Рисунок 19 – Анализ очистки и специфичности антитела fh8E: *а* – электрофореграмма очищенного полноразмерного антитела fh8E в нередуцирующих (1) и редуцирующих (2) условиях; *б* – вестерн-блот анализ очищенного антитела fh8E, выявленного поликлональными антителами козы против Fc-фрагмента IgG человека, 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 BOB-LIVP-GFP, разделенных с помощью полиакриламидного геля; *г* – вестерн-блот анализ белков вируса BOB-LIVP-GFP, разделенных с помощью ПААГ и выявленных полноразмерным антителом человека fh8E. М – маркер молекулярных масс #26614 (Fermentas)

Для подтверждения вируснейтрализующих свойств антитела fh1A и fh8E тестировали в реакции подавления бляшкообразования BOB *in vitro*. Использовали последовательные разведения антител в ФСБР (рН 7.2) с шагом 1:5, начиная с концентрации 312 мкг/мл. Антитела fh1A и fh8E продемонстрировали способность подавлять инфекционность BOB дозозависимым образом (Рисунок 20). Титр нейтрализации IC₅₀ определяли как разведение антитела, при котором наблюдалось 50 % уменьшение количества бляшек. В результате IC₅₀ составил около 34 мкг/мл.

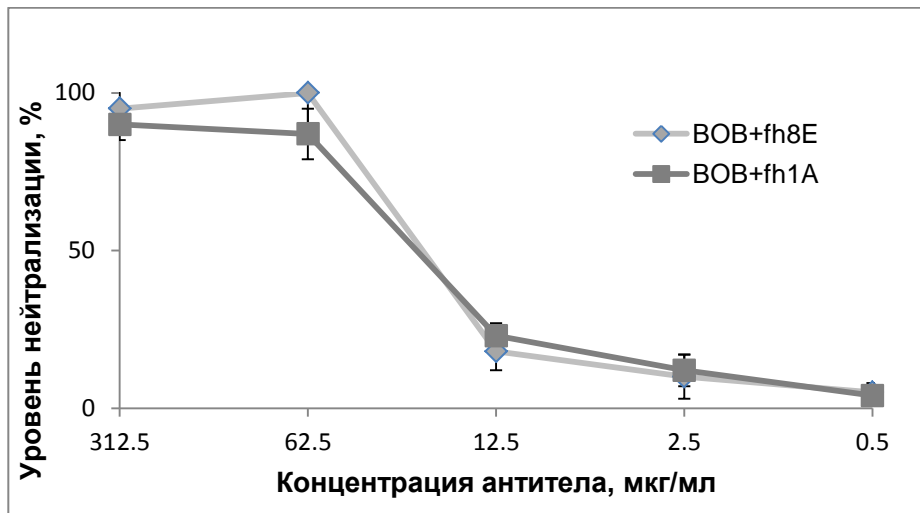


Рисунок 20 – Анализ вируснейтрализующей активности различных разведений антител fh1A и fh8E в отношении BOB-LIVP-GFP, взятого в разведении 320 БОЕ/мл. Приведены результаты двух независимых экспериментов, выполненных в трех повторах

Для визуализации взаимодействия анти-p35 Δ 12 антител с клетками, зараженными ортопоксвирусом, использовали лазерно-сканирующую микроскопию. 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. Результаты конфокальной микроскопии представлены на рисунке 21.

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*.

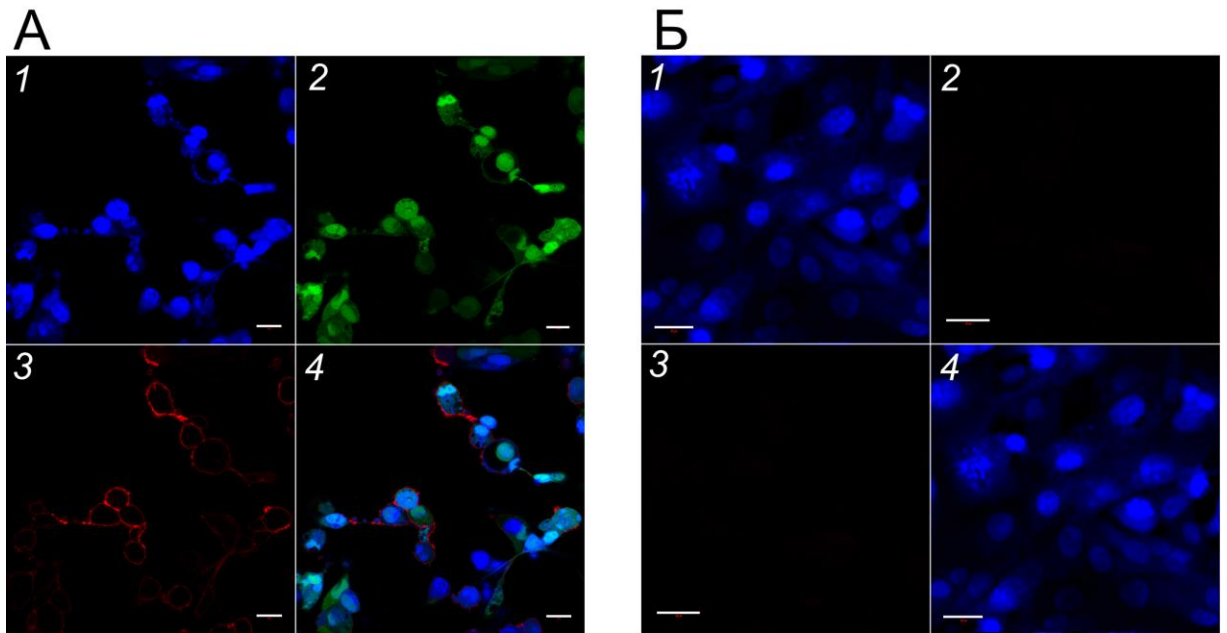


Рисунок 21 – Конфокальная микроскопия клеток *Vero E6*, зараженных вирусом осповакцины ЛИВП-GFP. Монослой зараженных (а) и незараженных (б) клеток инкубировали с полноразмерным антителом человека fh1A. Связавшиеся антитела выявляли антивидовым конъюгатом антител козы против IgG человека с Alexa Fluor 633. Дополнительно препараты окрашивали DAPI для выявления клеточных ядер. Изображения взаимодействия антител с клетками, зараженными ВОВ ЛИВП-GFP, получали с помощью конфокального микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия), шкала масштаба изображения соответствует 20 мкм. 1 – сигнал канала DAPI, 2 – сигнал канала GFP, 3 – сигнал канала Alexa Fluor 633, 4 – совмещенное изображение

3.10. Конструирование рекомбинантных плазмидных ДНК, обеспечивающих экспрессию укороченных вариантов белка р35 в клетках *E. coli*

С использованием компьютерного моделирования в теоретическом отделе ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» была предсказана третичная структура белка р35, кодируемого ОПТ Н3L ВОВ (Рисунок 22), а также с помощью алгоритма Veripred [Larsen et al., 2006] предложены его наиболее вероятные эпитопы:

- | | | |
|----|-------------|--------------------|
| 1. | 29-46 ако | INDQKFDDVKDNEVMPEK |
| 2. | 53-64 ако | KDDPDHYKDYAF |
| 3. | 71-81 ако | NIRNDDKYTHF |
| 4. | 90-99 ако | СТЕЕТKRNIA |
| 5. | 111-120 ако | TELENKKVEY |
| 6. | 125-131 ако | ENDNVIE |
| 7. | 140-146 ако | KAMHDKK |

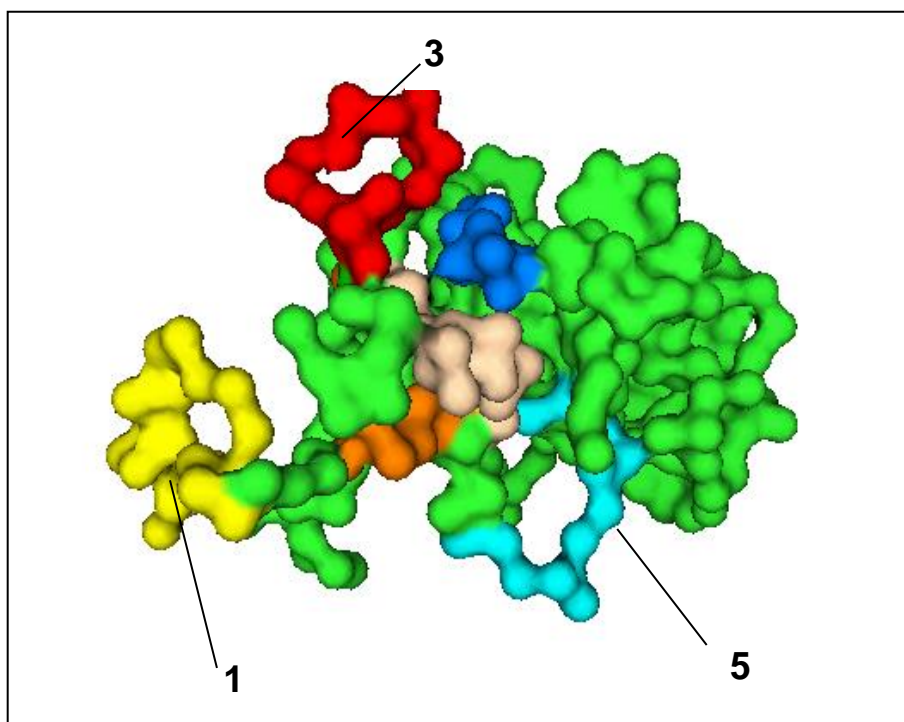


Рисунок 22 – Третичная структура белка р35 ортопоксвирусов (H3L BOB). Цветами показаны гипотетические эпитопы. 1, 3, 5 – эпитопы, возможно отвечающие за связывание с антителами

Из предсказанных линейных В-клеточных эпитопов белка р35 BOB наиболее вероятно за взаимодействие с антителами могли отвечать эпитопы, соответствующие фрагментам 1, 3 и 5. Учитывая это предсказание, а также индекс антигенности Jameson-Wolf [Jameson Wolf, 1988] и профиль гидрофобности Kyte-Doolittle [Kyte и Doolittle, 1982] были сконструированы 13 укороченных вариантов белка р35 (Рисунок 23).

Для получения рекомбинантных плазмидных ДНК, обеспечивающих экспрессию укороченных вариантов белка р35 в клетках *E. coli*, в качестве вектора использовали плазмиду рUR291 (Рисунок 24). Для встраивания последовательностей генов, кодирующих укороченные варианты белка, были подобраны праймеры таким образом, чтобы экспрессируемые укороченные белки р35 Δ N содержали на С-конце 15-20 свободных аао после исследуемого эпитопа, белки Δ 5 – Δ 8 и Δ 11 – на N-конце перед исследуемым эпитопом, что должно было обеспечить формирование корректной конформации белков, содержащих гипотетические эпитопы (Рисунок 25).

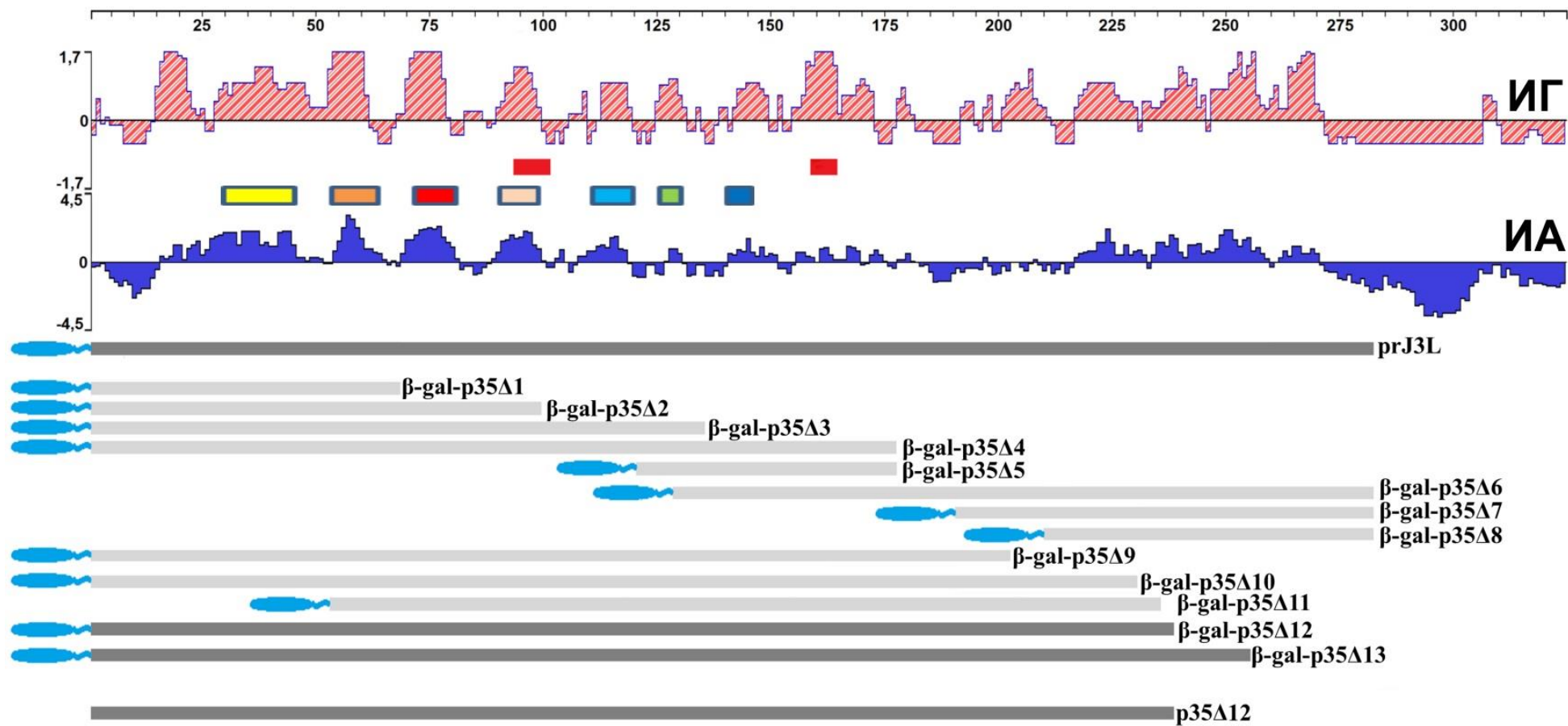


Рисунок 23 – Расположение возможных эпитопов белка p35 ВОК и схема укороченных вариантов p35. Профиль индекса антигенности Jameson-Wolf (ИА) показан заштрихованным красным цветом, профиль гидрофобности Kyte-Doolittle (ИГ) – синим цветом, предполагаемые сайты связывания гепарансульфата указаны красными прямоугольниками. Рекомбинантные белки p35Δ обозначены серыми прямоугольниками. Эллипсами слева показаны домены бета-галактозидазы

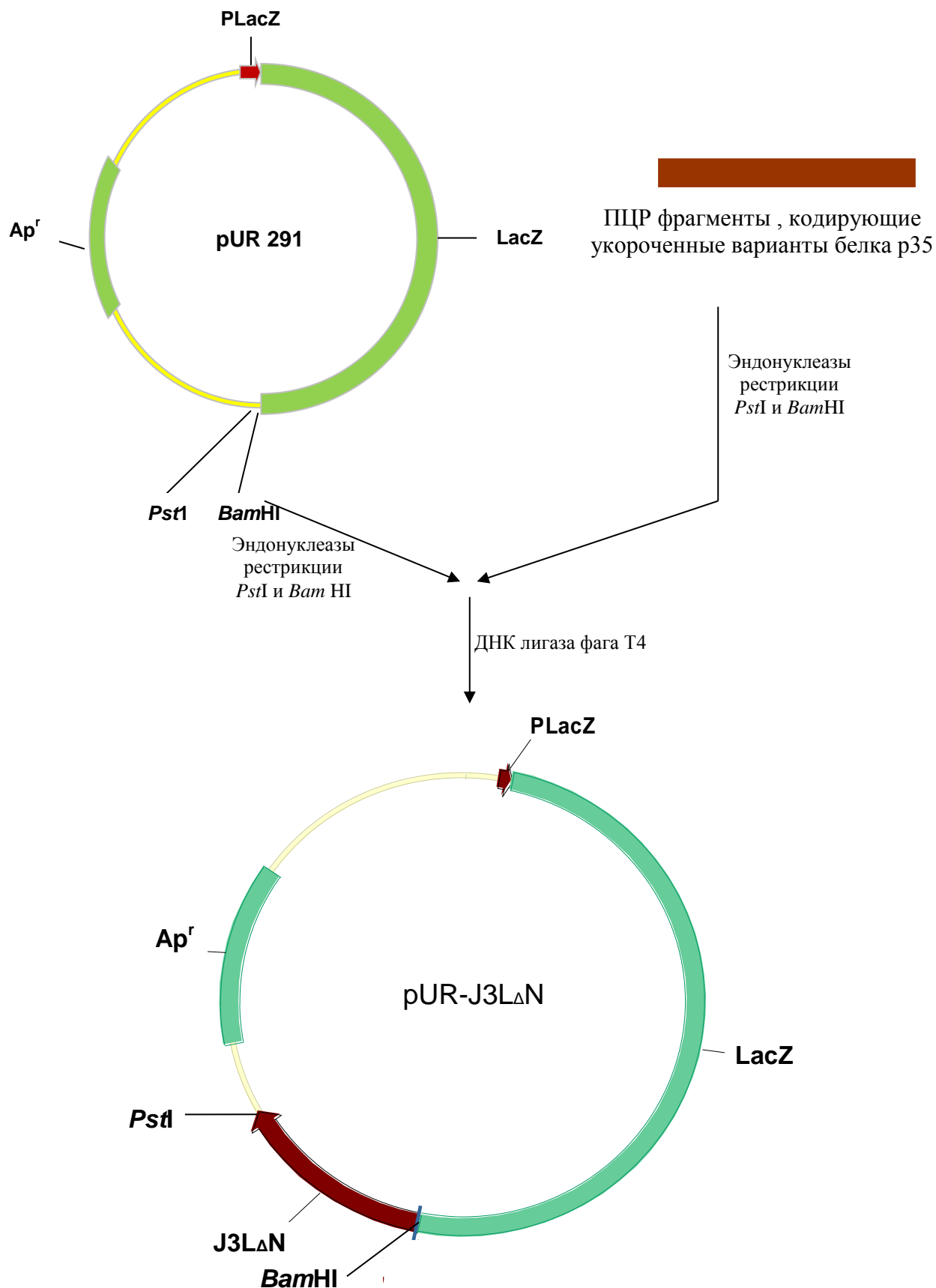


Рисунок 24– Схема конструирования плазмид pUR-J3LΔN, содержащих ген J3LΔN, кодирующий укороченные фрагменты белка p35 ВОК. Указаны сайты для эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI и *Pst*I; промотор лактозного оперона P lacZ; ген LacZ, кодирующий β-галактозидазу *E.coli*; Ap^r- ген устойчивости к ампициллину

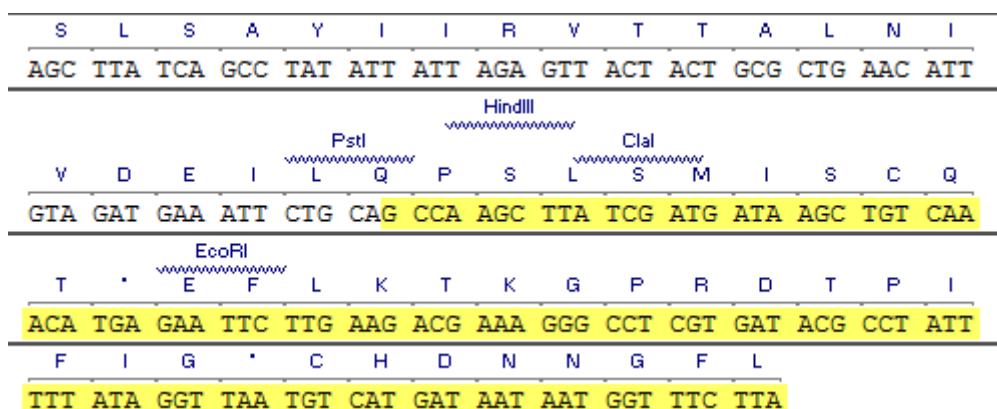


Рисунок 25 – Нуклеотидная последовательность, соответствующая 3'-концу гена, кодирующего белок p35Δ7 (J3L BOK). Цветом выделена последовательность полилинкера плазмиды, содержащего сайты рестрикции и стоп-кодоны

В последовательности прямых праймеров *Vam-1*, *Vam-2* и *Vam-3* был заложен сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции *VamHI*, в последовательности обратных праймеров J3L BackN и праймера *Pst-2*, комплементарного 3'-концу гена, – сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции *PstI*. Расчетная температура отжига праймеров составила 58-62 °C, практическая – 52 °C. Укороченные варианты ОПТ J3L BOK соответствовали парам праймеров, указанных в таблице 5.

С помощью полимеразной цепной реакции были наработаны ПЦР-фрагменты, кодирующие укороченные варианты ОПТ J3L BOK, названные J3LΔ1 – J3LΔ13. В качестве матрицы использовали плазмиду pUR-J3L, содержащую ген, кодирующий рекомбинантный белок p35 без трансмембранного домена. Расчетные длины амплифицированных фрагментов J3LΔN приведены в таблице 5. Результаты амплификации проверяли электрофоретически.

Плазмиду pUR291 и продукты амплификации, содержащие делеционные варианты J3LΔN, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *VamHI* и *PstI*. Затем полученные гидролизаты разделяли электрофоретически в 0,8% агарозном геле, после чего фрагменты нужной длины элюировали из геля. Обработанные указанными эндонуклеазами рестрикции фрагменты ДНК, кодирующие делеционные варианты белка p35, и плазмидную ДНК вектора объединяли в реакции лигирования с помощью ДНК-лигазы фага T4. Далее лигазную смесь использовали для трансформации клеток *E.coli*, штамм DH5αF', которые выращивали на среде с ампициллином (100мкг/мл) в присутствии X-gal и ИПТГ (2мМ). Наличие встройки

Таблица 5 – Расчетные характеристики укороченных вариантов белка p35 и праймеры, используемые для их клонирования.

№	Белок	Праймеры, используемые для клонирования	Длина и координаты укороченных вариантов белка p35	Расчетные молекулярные массы гибридных рекомбинантных белков
1	β -Gal-p35 Δ 1	ForBam-1 J3L Back1	68 ако 1-68	124 кДа
2	β -Gal-p35 Δ 2	ForBam-1 J3L Back2	99 ако 1-99	128 кДа
3	β -Gal-p35 Δ 3	ForBam-1 J3L Back3	135 ако 1-135	131 кДа
4	β -Gal- p35 Δ 4	ForBam-1 J3L Back4	177 ако 1-177	137 кДа
5	β -Gal-p35 Δ 5	ForBam-2 J3L Back4	55 ако 121-177	125 кДа
6	β -Gal-p35 Δ 6	ForBam-3 Back Pst-2	154 ако 128-282	133 кДа
7	β -Gal-p35 Δ 7	ForBam-4 Back Pst-2	93 ако 190-282	127 кДа
8	β -Gal-p35 Δ 8	ForBam-5 Back Pst-2	74 ако 209-282	125 кДа
9	β -Gal-p35 Δ 9	ForBam-1 J3L Back9	202 ако 1-202	143 кДа
10	β -Gal-p35 Δ 10	ForBam-1 J3L Back10	230 ако 1-230	141 кДа
11	β -Gal-p35 Δ 11	ForBam-6 J3L Back12	186 ако 54-239	138 кДа
12	β -Gal-p35 Δ 12	ForBam-1 J3L Back12	237 ако 1-239	144 кДа
13	β -Gal-p35 Δ 13	ForBam-1 J3L Back13	256 ако 1-255	145 кДа

фрагмента гена в плазмидных ДНК, выделенных из окрашенных колоний, подтверждали с помощью ПЦР, а также рестрикционным анализом. После отбора клонов, содержащих нужную вставку, определяли нуклеотидные последовательности плазмид секвенированием с праймеров PUR_SEQ1 и PUR_SEQ2Back.

Клетки *E. coli*, трансформированные результирующими плазмидами pUR-J3L Δ 1 – pUR-J3L Δ 13 культивировали в присутствии индуктора лактозного оперона ИПТГ. Оценку продукции гибридных белков проводили с помощью электрофоретического анализа клеточного лизата в 12% ПААГ с SDS (Рисунок 26). В качестве контроля использовали лизат клеток, несущих векторную плазмиду pUR-J3L, содержащую вставку гена, кодирующего белок р35 ВОК, и лизат клеток, несущих исходную векторную плазмиду pUR291. Расчетные молекулярные массы гибридных рекомбинантных белков β -Gal-p35 Δ 1 – β -Gal-p35 Δ 13 приведены в таблице 5.

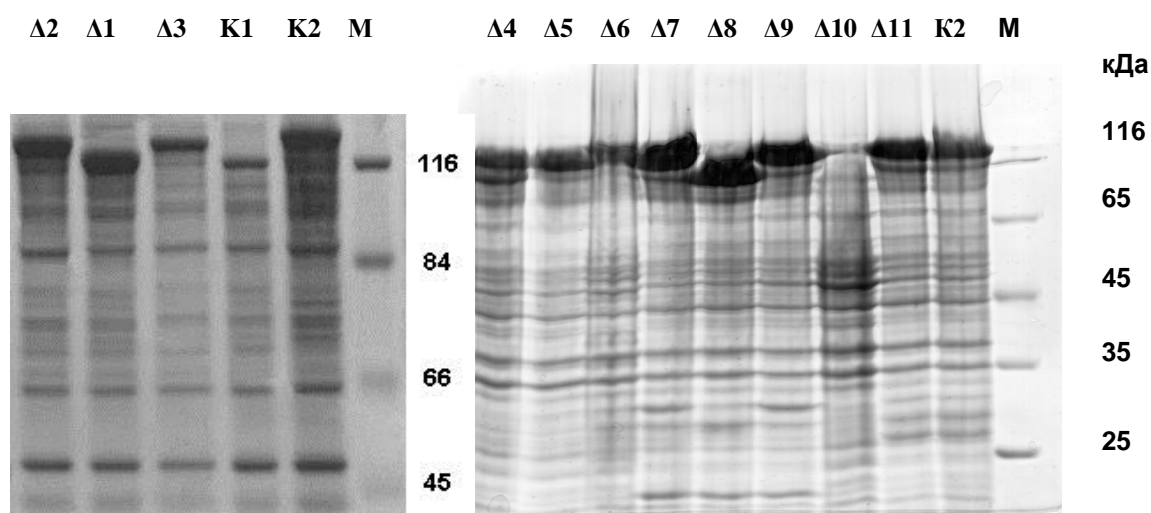


Рисунок 26 – Электрофореграмма лизатов клеток *E. coli*/ pUR-J3L Δ N, после 16 часов культивирования в присутствии ИПТГ. K1 – лизат клеток *E. coli*/ pUR291, K2 – лизат клеток *E. coli*/ pUR-J3L

Результаты экспериментов показали, что после индукции ИПТГ лизаты клеток *E. coli*, трансформированных плазмидами pUR-J3L Δ N, содержали белки, молекулярные массы которых соответствовали расчетным молекулярным массам гибридных рекомбинантных белков. Лизаты клеток *E. coli*, трансформированных плазмидами pUR291 и pUR-J3L, после индукции ИПТГ содержали рекомбинантные белки массами около 116 кДа и около 150 кДа, соответствующие β -Gal и β -Gal-p35.

3.11. 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, fh8E и fhb9 связывать укороченные варианты белка p35 исследовали с помощью вестерн-блот анализа. Для этого лизаты клеток *E. coli*, несущих плазмиды pUR-J3L, pUR291 и pUR-J3L Δ 1 - pUR-J3L Δ 13, фракционировали в 12% ПААГ с 0,1% SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Полоски мембраны после блокировки мест неспецифического связывания инкубировали с фаговыми антителами 1А, 4Н, 6Н и полноразмерными антителами человека. В качестве контроля неспецифического связывания фаговых антител один из стрипов инкубировали с бактериофагом M13K07, не экспонирующим на своей поверхности одноцепочечные антитела. В качестве контроля неспецифического связывания полноразмерных антител использовали химерное антитело ch14D5. В качестве положительного контроля использовали полоску нитроцеллюлозной мембраны с лизатом *E. coli*, содержащим белок β -Gal-p35, который ранее выявлялся фаговыми антителами. Отрицательным контролем неспецифического связывания служила полоска нитроцеллюлозной мембраны с лизатом *E. coli*, содержащим белок β -Gal.

Фаговые и полноразмерные антитела выявляли белки β -Gal-p35 Δ 12 и β -Gal-p35 Δ 13, которые включали 1–239 и 1–255 аао белка p35, соответственно, а также исходный pJ3L (1–282 аао) (Рисунок 27). Химерные белки



Рисунок 27 – Связывание антител, отобранных против вируса экстремелии, на примере антитела fh1A с лизатами клеток *E. coli*, трансформированных плазмидами pUR-J3L Δ N, pUR-J3L (p35) и pUR291 (β -Gal)

без N-концевых частей (1–54 ако) и те, что короче 239 ако, не выявлялись фаговыми и полноразмерными антителами. Полученные данные указывают на то, что эпитоп, ответственный за распознавание нейтрализующими 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 (Рисунок 23).

Для получения рекомбинантной плазмидной ДНК, обеспечивающей экспрессию белка р35Δ12 в клетках *E. coli*, в качестве вектора использовали плазмиду рQE30. С помощью полимеразной цепной реакции с использованием праймеров Bam-1 и J3L Back12 был наработан ПЦР-фрагмент, кодирующий укороченный вариант J3LΔ12. В качестве матрицы использовали плазмиду рUR-J3L. Плазмиду рQE30 и ПЦР-фрагмент J3LΔ12 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Pst*I. Затем полученные гидролизаты разделяли электрофоретически в 0,8% агарозном геле, после чего фрагменты нужной длины элюировали из геля, затем объединяли в реакции лигирования с помощью ДНК-лигазы фага T4. Далее лигазную смесь использовали для трансформации клеток *E. coli*, штамм XL1Blue, которые выращивали на среде с ампициллином (100мкг/мл). Наличие встройки фрагмента гена в плазмидных ДНК подтверждали с помощью ПЦР. После отбора клонов, содержащих нужную вставку, определяли нуклеотидные последовательности плазмид секвенированием с праймеров PQE_SEQ1 и PQE_SEQ1Back (Рисунок 28).

Клетки *E. coli* XL1Blue, содержащие результирующую плазмиду рQE-p35Δ12, культивировали в присутствии индуктора лактозного оперона ИПТГ. Оценку продукции гибридных белков проводили с помощью электрофоретического анализа клеточного лизата в 12% ПААГ с SDS (Рисунок 29). Результаты этого анализа показали наличие в индуцированной культуре клеток XL1Blue/pQE-p35Δ12 дополнительного белка с молекулярной массой около 30 кДа, что соответствовало расчетной молекулярной массе рекомбинантного белка р35Δ12. В качестве контроля использовали лизат индуцированных клеток *E. coli* XL1Blue/pQE30 и клеток *E. coli* XL1Blue.

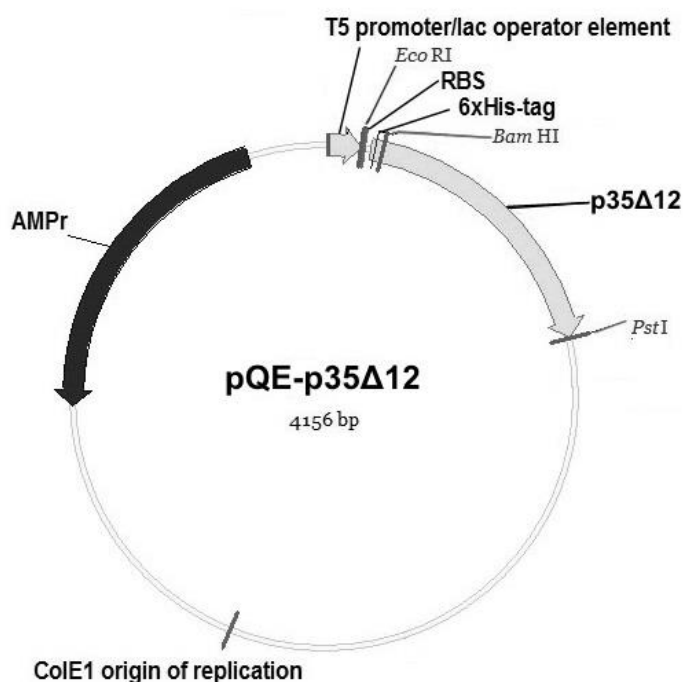


Рисунок 28 –Схема плазмидной ДНК pQE-p35Δ12. Указаны сайты для эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Pst*I; p35Δ12 – ген, кодирующий белок p35Δ12; AMPr- ген устойчивости к ампициллину; 6×His-tag – полигистидиновая последовательность

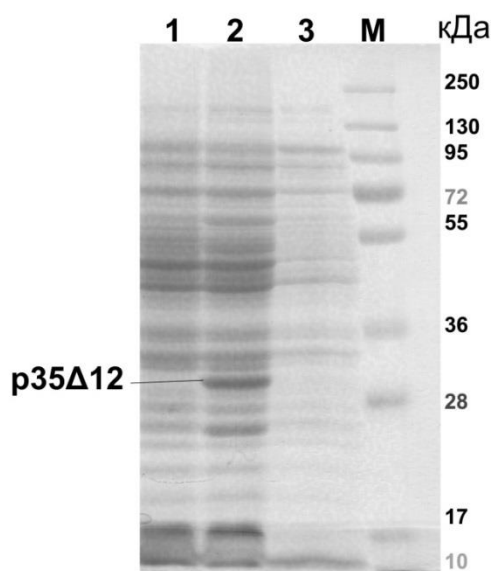


Рисунок 29 – Электрофореграмма в 12,5% SDS-ПААГ лизатов клеток *E.coli*. 1 – индуцированная культура клеток *E.coli* XL1Blue/pQE30, 2 – индуцированная культура клеток *E.coli* XL1Blue/pQE-p35Δ12, 3 – индуцированная культура клеток *E.coli* XL1Blue, M – маркер молекулярных масс

Рекомбинантный белок p35Δ12, наработанный в клетках *E. coli* XL1-blue, очищали из фракции растворимых цитоплазматических белков с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе (Sigma, США). Полученные в результате очистки белковые фракции анализировали электрофоретически в 12,5 % ПААГ (Рисунок 30). Определение концентрации рекомбинантного белка p35Δ12 вируса оспы коров в препаратах проводили по методу Брэдфорда. Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин. Общий выход белка p35Δ12 составил 300 мг из 1 л культуры клеток *E. coli*.

При очистке целевого белка с помощью аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA сефарозы вместе с белком p35Δ12 с молекулярной массой около 30 кДа со-очищался клеточный белок с молекулярной массой около 25 кДа (Рисунок 30).

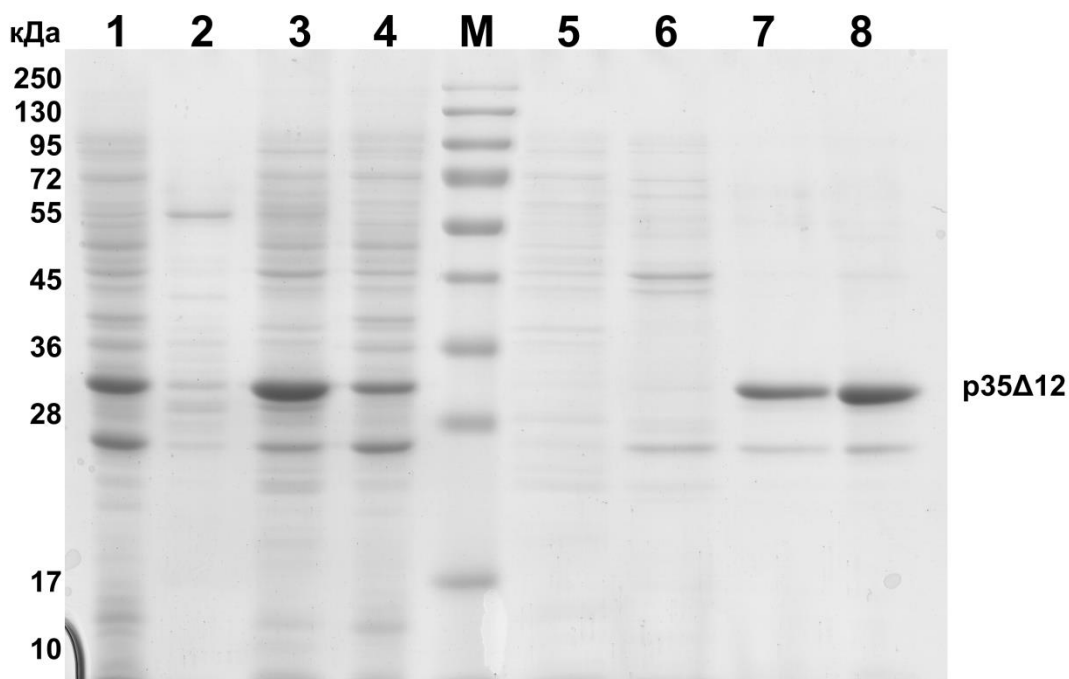


Рисунок 30 – Электрофореграмма в 12,5% SDS-ПААГ клеточных и белковых фракций *E. coli* XL1Blue/pQE30-p35Δ12. Дорожки в геле: 1 – индуцированная культура клеток *E. coli* XL1Blue/pQE30-p35Δ12, 2 – периплазматическая фракция, 3 – фракция растворимых белков цитоплазмы, 4 – фракция телец включения, 5 – фракция белков, не связавшихся с Ni-NTA, 6 – элюат после 25 мМ имидазола, 7 – элюат после 100 мМ имидазола, 8 – концентрированный очищенный белок p35Δ12, М – маркеры молекулярных масс

3.12. Исследование антигенных свойств белка p35Δ12 ортопоксвирусов

Связывание очищенного белка p35Δ12 с вируснейтрализующим фаговым антителом 1A, полноразмерным антителом fh1A и сыворотками доноров, вакцинированных осповакциной, которые ранее использовались для создания иммунной фаговой библиотеки, исследовали методом вестерн-блот анализа (Рисунок 31). В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку невакцинированного осповакциной донора и химерное антитело ch14D5 против гликопротеина E вируса клещевого энцефалита [Вауков et al., 2014]. Для этого после электрофореза и переноса белка p35Δ12 на нитроцеллюлозную мембрану, сайты неспецифического связывания блокировали раствором 5% сухого молока в ФСБР и инкубировали с 300 нг антител либо с сыворотками доноров в разведении 1:200. Дополнительный белок с молекулярной массой около 25 кДа не выявлялся.

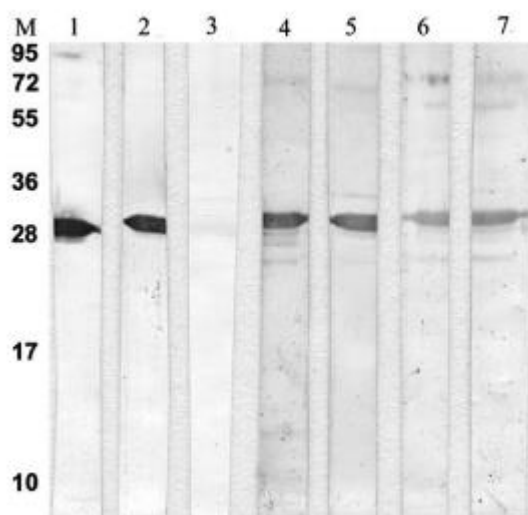


Рисунок 31 – Вестерн-блот анализ очищенного белка p35Δ12 с 1 – нейтрализующим фаговым антителом 1A, 2 – fh1A, 3 – неспецифическим химерным антителом ch14D5 и 4 - 7 – сыворотками (разведенными 1:200) добровольцев, вакцинированных ВОВ. Массы белкового маркера в килодальтонах показаны с левой стороны геля

Способность рекомбинантного p35Δ12 поддерживать конформацию белка ортопоксвируса p35 была подтверждена с помощью конкурентного ИФА. Антитело fh1A в концентрации 3,5 нг предынкубировали 30 мин с различными концентрациями рекомбинантного белка p35Δ12, начиная с 5 мг/мл с шагом 1:2, и вносили в лунки с предварительно сорбированным вирусом осповакцины и инкубировали 30 мин при 37°C, затем проявляли. Результаты показали, что p35Δ12 конкурировало с ВОВ и

ингибировало связывание fh1A с ВОВ с 50% максимальной ингибирующей концентрацией 62,5 нг / мл (Рисунок 32).

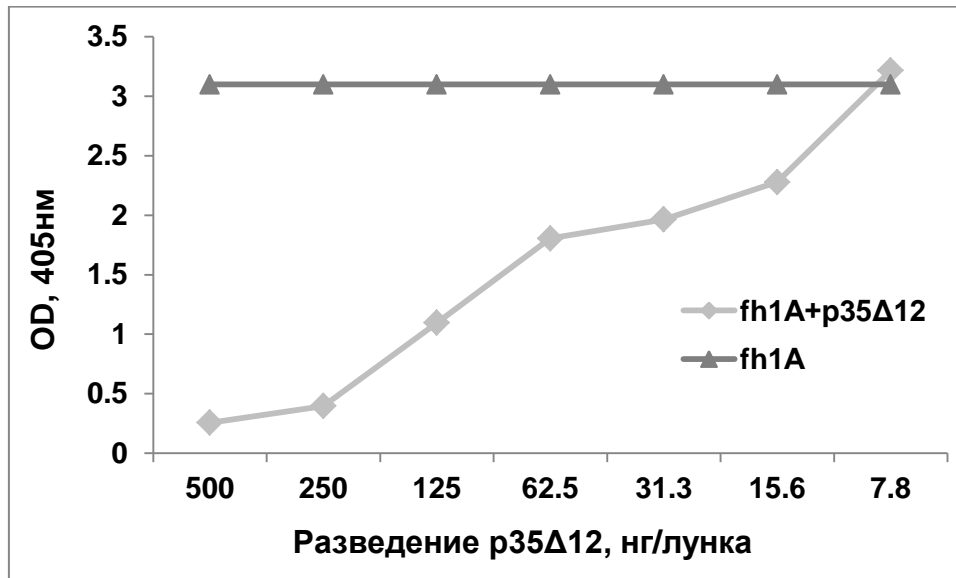


Рисунок 32 – Конкурентное связывание рекомбинантного белка p35Δ12 и ВОВ с антителом. Антитело fh1A в концентрации 3,5 нг предынкубировали 30 мин с различными концентрациями рекомбинантного белка p35Δ12 и вносили в лунки с предварительно сорбированным ВОВ (200 нг/лунка)

Взаимодействие полноразмерных антител fh1A, fh8E и fhb9 с рекомбинантным белком p35Δ12 исследовали методом поверхностного плазмонного резонанса на оптическом биосенсоре ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Антитело fh1A иммобилизовали на поверхность GLC чипа, а белок p35Δ12 использовали в качестве аналита. График, иллюстрирующий это взаимодействие, представлен на рисунке 33 А. Измерение динамических констант для антитела fh1A показало, что константы ассоциации и диссоциации составили: $k_{off} = (1,74 \pm 0,01) \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ $k_{on} = (4,32 \pm 0,02) \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, соответственно. Константа аффинности для взаимодействия между антителом fh1A и очищенным рекомбинантным белком p35Δ12, рассчитанная как $K_D = k_{off} / k_{on}$, составила 40 нМ. Для антител fh8E и fhb9 измерение аффинности проводили аналогично. Константы ассоциации и диссоциации антитела fh8E составили: $k_{off} = (5,6 \pm 0,01) \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ $k_{on} = (4,9 \pm 0,02) \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, соответственно; равновесная константа аффинности антитела fh8E равнялась 12 нМ. Равновесная константа аффинности антитела fhb9 равнялась 27 нМ. Таким образом, все сконструированные антитела имели наномолярную аффинность, причем аффинность fh8E < fhb9 < fh1A.

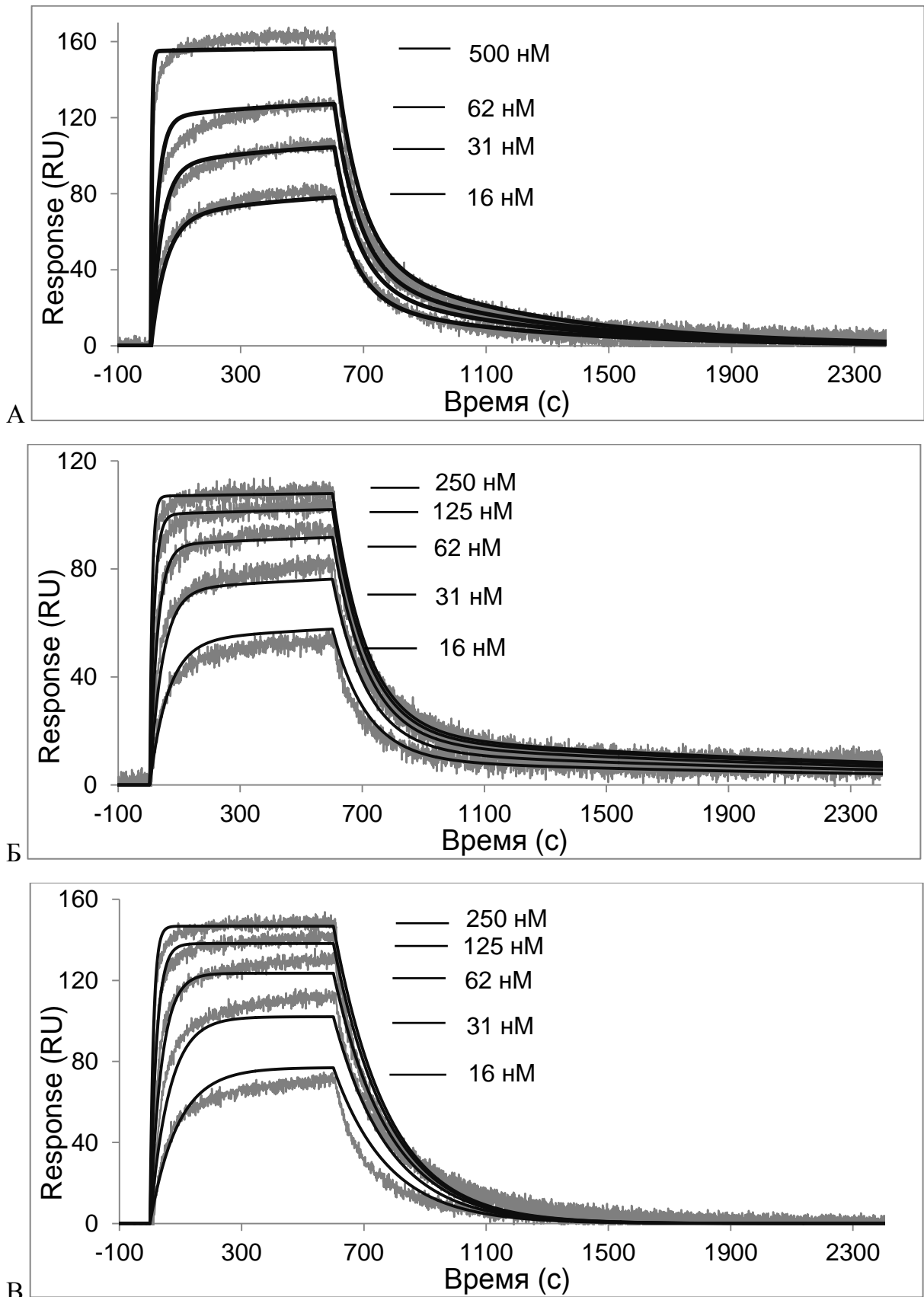


Рисунок 33 – Измерение константы аффинности связывания антитела fh1A (А), fh8E (Б) и fhb9 (В) с рекомбинантным белком p35Δ12. Антитела иммобилизовали на поверхность GLC чипа. В качестве анализа использовали серийные двукратные разведения p35Δ12 в ФСБР. Расчетные кривые обозначены черными линиями

3.13. Изучение иммуногенности белка p35Δ12 ортопоксвирусов

Для изучения иммуногенности мышей BALB/c иммунизировали очищенным белком p35Δ12 по так называемой «короткой схеме» - белок вводили 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 p35Δ12 методами ИФА и вестерн-блот анализа. Данные ИФА связывания белка p35Δ12 сыворотками иммунизированных мышей подтвердили наличие специфических антител в этих сыворотках (Рисунок 34). Вестерн-блот анализ продемонстрировал, что эти сыворотки выявляли белок p35Δ12, перенесенный на нитроцеллюлозную мембрану (Рисунок 35).

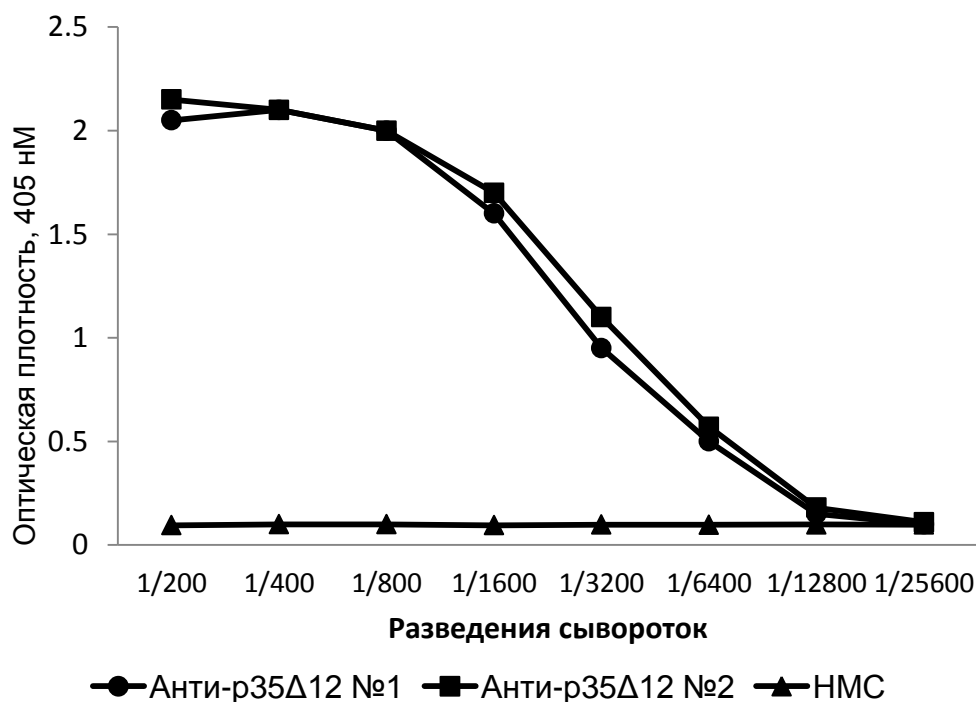


Рисунок 34 – Иммуноферментный анализ связывания белка p35Δ12 сыворотками иммунизированных мышей (приведены результаты анализа двух сывороток) и нормальной мышиной сывороткой. Черными квадратами и кружками отмечены кривые связывания сывороток вакцинированных мышей, треугольниками – нормальной мышиной сыворотки (НМС)

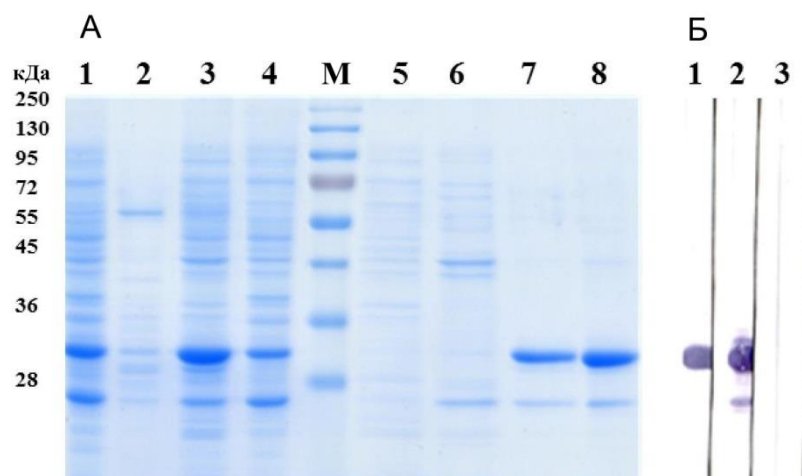


Рисунок 35 – XL1Blue/pQE30- Δ 12 (А) и вестерн-блот анализ очищенного белка р35 Δ 12 (Б). Дорожки в геле: 1 – индуцированная культура клеток *E. coli* XL1Blue/pQE30- Δ 12, 2 – периплазматическая фракция, 3 – фракция растворимых белков цитоплазмы, 4 – фракция телец включения, 5 – фракция белков, не связавшихся с Ni-НТА, 6 – элюат после 25 мМ имидазола, 7 – элюат после 100 мМ имидазола, 8 – концентрированный очищенный белок р35 Δ 12, М – маркеры молекулярных масс. Стрипы нитроцеллюлозной мембраны, с перенесенным белком р35 Δ 12, проявленные: 1 – fh1A, 2 – объединенной сывороткой иммунизированных мышей, 3 – нормальной мышиной сывороткой

Для визуализации взаимодействия анти-р35 Δ 12 антител, находящихся в сыворотках иммунизированных мышей, с клетками, зараженными ортопоксвирусом, использовали лазерно-сканирующую микроскопию. В экспериментах применяли ВОВ, штамм 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 ВОВ ЛИВП-GFP и инкубировали с сыворотками мышей, иммунизированных р35 Δ 12, в качестве отрицательного контроля использовали нормальную мышиную сыворотку. Мышиные антитела выявляли конъюгатом антивидовых антител с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 633. Этот флуорофор возбуждается светом с длиной волны 633 нм, и при детекции в световой области 630-700 нм объекты, меченные Alexa Fluor 633, окрашиваются красным цветом.

Результаты конфокальной микроскопии представлены на рисунке 36. 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.

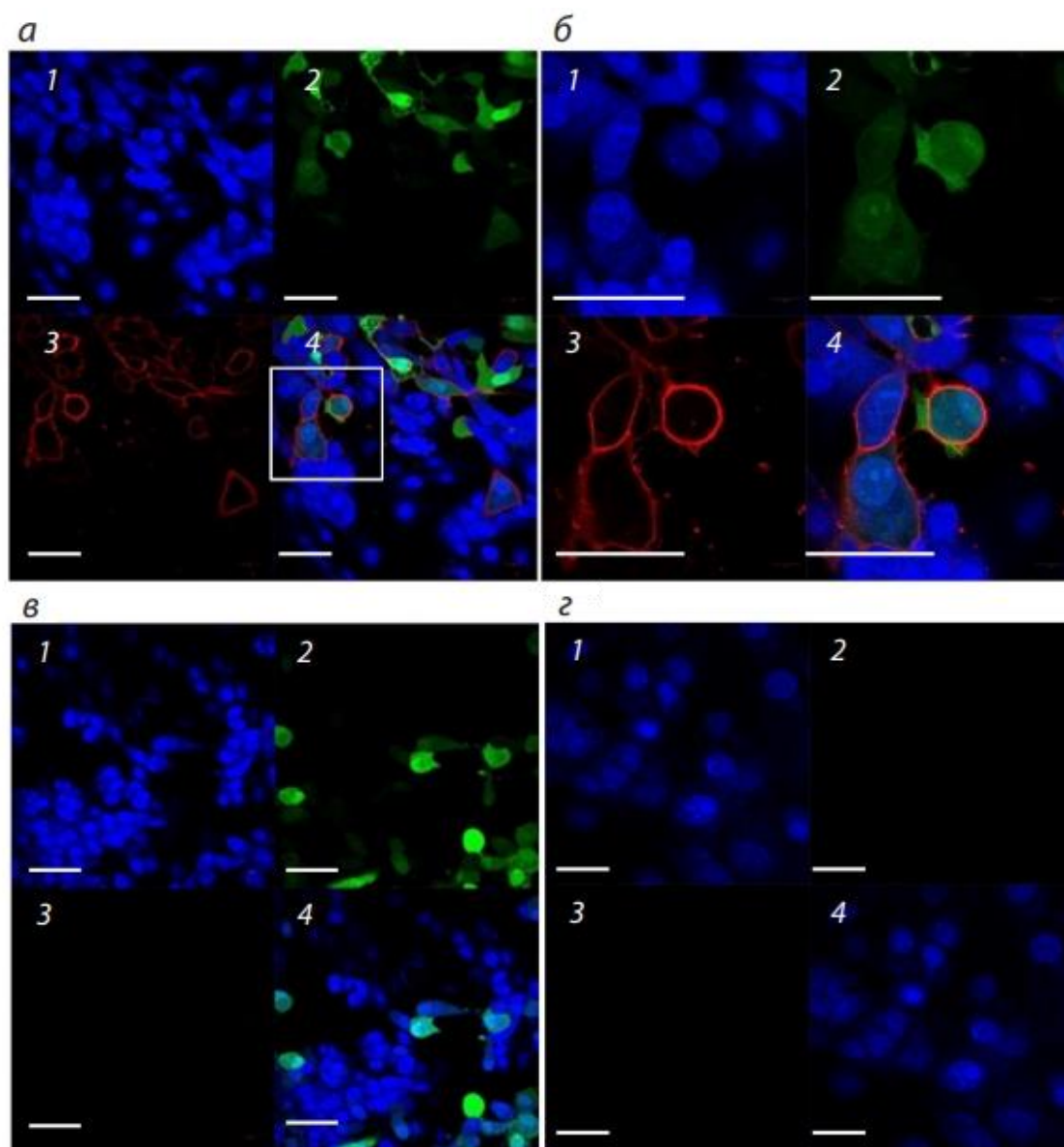


Рисунок 36 – Конфокальная микроскопия клеток *Vero E6*, зараженных вирусом осповакцины ЛИВП-GFP. Монослой зараженных клеток инкубировали с сыворотками мышей, иммунизированных белком $r35\Delta12$ (а и б) и с нормальной мышинной сывороткой (в). Монослой незараженных клеток инкубированный с сыворотками мышей, иммунизированных белком $r35\Delta12$ (г). Связавшиеся антитела выявляли антивидовым конъюгатом антител козы против IgG мыши с Alexa Fluor 633. Дополнительно препараты окрашивали DAPI для выявления клеточных ядер. Изображения взаимодействия антител с клетками, зараженными ВОВ ЛИВП-GFP, получали с помощью конфокального микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия), шкала масштаба изображения соответствует 10 мкм. 1 – сигнал канала DAPI, 2 – сигнал канала GFP, 3 – сигнал канала Alexa Fluor 633, 4 – совмещенное изображение

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. При инкубации этого вируса с различными разведениями мышинных сывороток обнаружили снижение инфекционности вируса более, чем на 50 %, при разведении сывороток 1:20 и 1:100. Нормальная мышинная сыворотка, полученная от неиммунизированного животного, такой способностью не обладала (Рисунок 37).

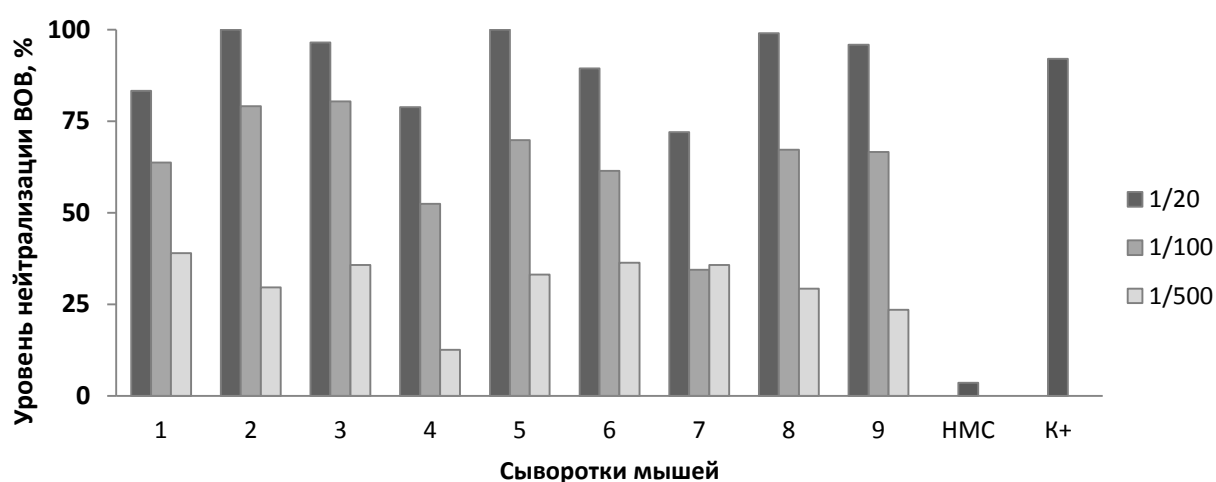


Рисунок 37 – Нейтрализация различными разведениями сывороток мышей, иммунизированных белком р35Δ12, бляшкообразования вируса осповакцины ЛИВП-GFP на культуре клеток Vero E6. Приведены результаты вируснейтрализующей активности сывороток 9 иммунизированных мышей, а также нормальной мышинной сыворотки (отрицательный контроль) и сыворотки многократно вакцинированного вирусом осповакцины 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

3.14. Картирование вируснейтрализующего эпитопа с использованием пептидных библиотек

Для более точной локализации вируснейтрализующего эпитопа из двух комбинаторных фаговых библиотек случайных пептидов были отобраны пептиды, связываемые с антителом fh1A, направленным к эпитопу белкар 35 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. Для этого антитело fh1A сорбировали в лунки иммунологического планшета в концентрации 200 нг на лунку, и после блокировки мест неспецифического связывания вносили 10^{12} БОЕ/мл фаговых частиц. После удаления не связавшихся с антителом бактериофагов, элюировали связавшиеся бактериофаги, затем полученным фаговым элюатом инфицировали культуру клеток *E. coli* ER2738. Клетки культивировали и выделяли из них фаговые частицы, которые использовали для следующего раунда аффинной селекции.

Особенностью процедуры биоэнринга является то, что в отобранной после раундов аффинной селекции библиотеке находятся не только фаги, экспонирующие пептиды, специфичные к сорбированному антителу, но и фаги, несущие пептиды, отобранные на блокирующий агент. Для того чтобы исключить отбор пептидов на блокирующие агенты, в первом, втором и третьем раундах применяли различные агенты для блокирования мест неспецифического связывания: в первом и втором раунде использовали 3% раствор сухого молока, а в третьем раунде – 3% раствор БСА. Чтобы исключить отбор фагов на константные домены антитела fh1A, фаговую библиотеку предварительно инкубировали с рекомбинантным антителом ch14D5 [Вауков et al., 2014], 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 проанализировали 378 клонов, 46 из которых содержали пептидную встройку. Способность отобранных бактериофагов связывать антитело fh1A подтверждали методом ИФА. Для этого в

лунки иммунологических планшетов сорбировали специфическое антитело fh1A, к которому после блокировки мест неспецифического связывания вносили исследуемый бактериофаг в разведении 10^{10} БОЕ/мл. В качестве контроля неспецифического связывания использовали бактериофаг, не несущий чужеродный пептид на своей поверхности. 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 в обоих направлениях, на основе полученных нуклеотидных последовательностей были определены последовательности связавшихся с антителом fh1A пептидов.

Девять различных пептидов были отобраны из библиотеки Ph.D.-12, и три из них имели общий мотив GLHTSATNLYL (Таблица 6). Ни один из отобранных пептидов не содержал последовательность, обладающую сходством с последовательностью белка р35. Из библиотеки Ph.D.-C7C было отобрано восемь пептидов, четыре из них включали в себя J3L-подобные последовательности, присутствующие в р35 Δ 12 (Таблица 6, Рисунок 38), которые распознавались нейтрализующими фаговыми антителами, fh1A и сыворотками вакцинированных доноров (Рисунок 31). Среди отобранных пептидов были выделены три мотива: 15 (A / D) uXPS $^{19, 190}$ IBuuTAL 196 и 232 N (S / A) KYX 237 (B означает основной ако, X – гидрофобный ако, ц соответствует любому ако (Рисунок 39).

Согласно трехмерной структуре фрагмента белка H3L BOB (PDB 5EJ0, Singh et al., 2016), мотивы 1 и 3 локализованы на петлях, 13 VIDRLPSETFPNVHEHINDQKF 34 и 231 DNAAKYVEH 239 , соответственно; мотив 2, на правильной альфа-спирали 191 IRVTTALNIVDEIK 204 (Рисунок 39). 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.

Таблица 6. Последовательности пептидов, экспонированных на поверхности нитчатого бактериофага, отобранные из комбинаторных фаговых библиотек Ph.D.-12 и Ph.D.-C7C и способные связываться с антителом fh1A, направленным к белку p35 ортопоксвирусов

	Ph.D.-12	Ph.D.-C7C
1	GLHTSATNLYLH	GPTAKYI
2	SGLHTSATNLYL	SLFSKNY
3	GLHTSATNLYLQ	VPSKPGL
4	SGVYKVAYDWQH	TYLNSAK
5	WIRPPSGPMYSF	HGSHNFT
6	QWNWPVRSVANV	IHSPTAL
7	GDGNSVLKPGNW	KDFSTRH
8	HPHDYNDLTSPF	NMHTPMV
9	SALKGLFPADHH	-

Последовательность p35	A* 13 VIDRLPSETFPNVHEHINDQK ³⁴ ACVPSKPGLC (n = 3)
Мотив 1	15 (A/D) uXPS ¹⁹
Последовательность p35	190 IRVTTALNIVDEIIK ²⁰⁴ ACIHSPTALC (n = 1)
Мотив 2	190 IBuuTAL ¹⁹⁶
Последовательность p35	S* 231 D ^N AAKYVEH ²³⁹ ACGPTAKYIC (n = 5) ACTYLNSAKC (n = 3)
Мотив 3	232 N(S/A) AKYX ²³⁷

Рисунок 38– Эпитопное картирование антитела fh1A. Результаты скрининга фаговой библиотеки пептидов, взаимодействующих с антителом fh1A. Выравнивание гомологичных фрагментов белка p35 ортопоксвирусов и пептидов, отобранных из библиотеки Ph.D.-C7C. Количество клонов, продуцирующих отобранные пептиды, указано в скобках. Распознанные мотивы показаны жирным шрифтом, где В означает основной ато, Х – гидрофобный ато, u соответствует любому ато. Варибельные ато отмечены звездочками

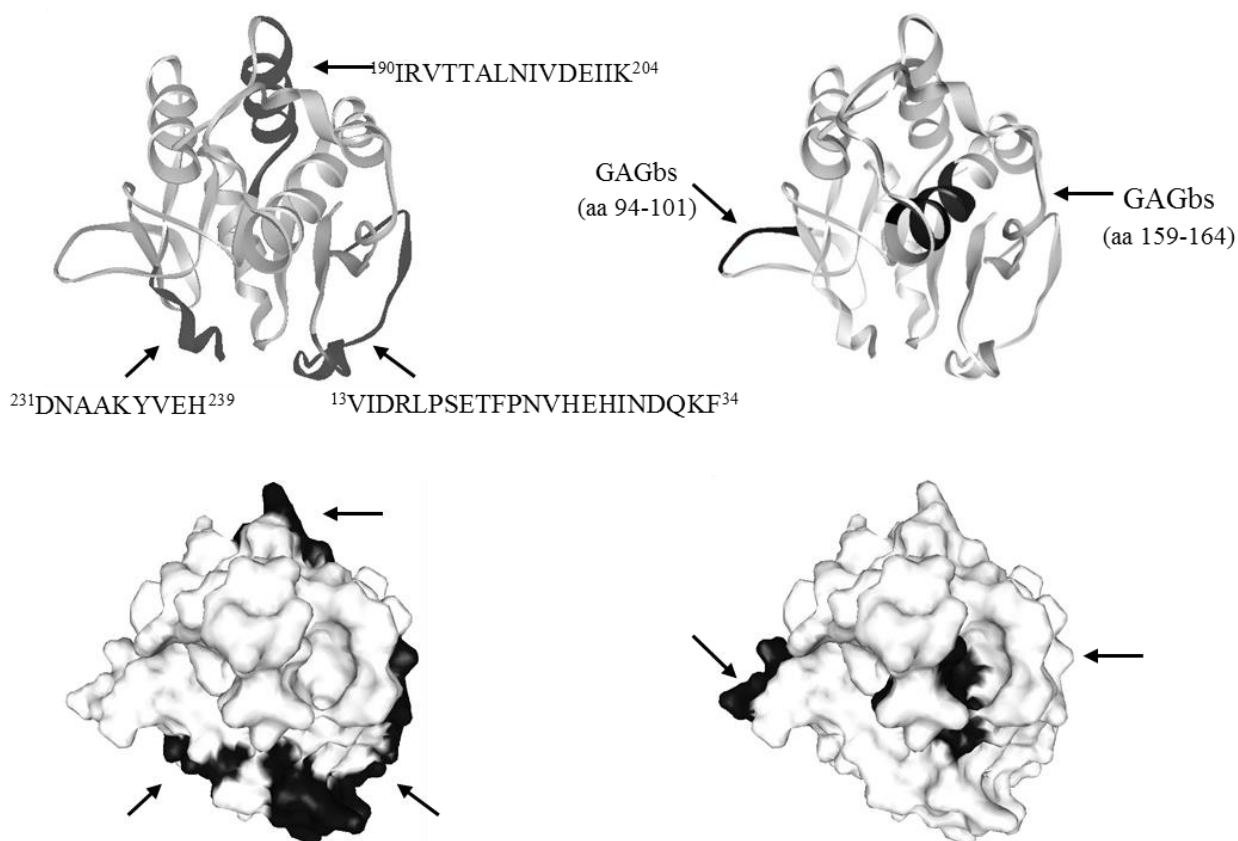


Рисунок 39 – 3D-структуры белка НЗЛ ВОВ (PDB 5EJ0) с указанными предполагаемыми нейтрализующими эпитопами и сайтами связывания гликозаминогликанов (GAGbs). Молекулярные координаты для белка р35 ВОВ (PDB 5EJ0), используемого в структурном анализе, были получены из базы данных белков, а затем визуализированы с использованием 3D-Mol Viewer (компонент Vector NTI Suite 8.0). Трехмерная структура белка J3L ВОК была предсказана с использованием сервиса онлайн-моделирования методом гомологичного выравнивания I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)

Глава 4. Обсуждение

Получение рекомбинантных антител, специфичных к различным вирусам, методом фагового дисплея стало стандартной практикой. Предварительный скрининг отобранных антител в формате фаговых антител на предмет специфичности к мишени и нейтрализующей способности облегчает выбор наиболее перспективных V_H и V_L доменов для конструирования целых молекул иммуноглобулинов.

Важная роль антител в опосредованной вакцинами защите от ортопоксвирусов объясняет интерес исследователей к созданию антиортопоксвирусных антител. Одним из возможных подходов к разработке полностью человеческих антител является отбор V_H- и V_L- доменов антител, которые естественным образом встречаются у иммунизированных доноров, методом фагового дисплея. Затем отобранные V-домены могут быть объединены с соответствующими константными доменами иммуноглобулинов человека. Этот подход был использован в данном исследовании. И в результате были отобраны V_H и V_L домены антител человека, способных нейтрализовать патогенные ортопоксвирусы.

Чтобы получить репертуар специфических к ортопоксвирусам антител использовали библиотеку фаговых антител, сконструированную на основе РНК периферических лимфоцитов добровольцев, иммунизированных ВОВ. Вирус экстремелии 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 нейтрализующие антитела к различным ортопоксвирусам, в том числе патогенным для человека.

Вирус экстремелии был описан в 1930 году Маршалом во время вспышки инфекции среди лабораторных мышей. Вирус экстремелии представляет собой специфический для мышей ортопоксвирус, который после инфицирования вызывает оспу мышей у большинства штаммов мышей. Оспа мышей - это острое, системное, очень опасное для жизни заболевание, очень похожее на оспу, вызываемую специфическим для человека вирусом натуральной оспы [Fenner et al, 1988]. Размер

частиц ВЭ, выделенных из зараженных клеток, составляет $280 \times 180 \times 140$ нм. Геном ВЭ, штамм Moscow, был полностью секвенирован и составляет приблизительно 209800 п.н. Несмотря на серологическое и морфологическое сходство с другими ортопоксвирусами ВЭ специфичен для мышей и безопасен для людей, в отличие от ВНО [Fenner et al, 1988]. Вакцинация людей и мышей ортопоксвирусами приводит к выработке антител к различным иммуногенным белкам, при этом существует ряд белков высокоиммуногенных для обоих видов: 35, 59, 62, 27, 14 кДа [Demkovicz et al., 1992; Jones-Trower et al., 2005]. ВЭ используется для исследования взаимодействий вирус-хозяин и тестирования препаратов, направленных против ВНО и ВОВ [Ewert, 2003; Ichihashi, 1996; Parker S, 2008].

Поскольку ВНО имеет ограниченный спектр хозяев и, как известно, инфицирует только людей, близкородственные ортопоксвирусы, такие как ВОО и ВЭ, широко используют в животных моделях для исследования патогенеза и иммунного ответа. В настоящее время ВЭ является лучшим аналогом для изучения ВНО, поскольку он является инфекционным при очень низких дозах, имеет ограниченный диапазон хозяев, кодирует аналогичный набор белков «уклонения» от иммунной системы и вызывает тяжелое заболевание лабораторных мышей с высоким уровнем смертности [Esteban и Buller, 2005; Fenner et al, 1988; Seet et al, 2003]. Дополнительные сходства между оспой человека и мышей включают репликацию и передачу (трансмиссию) вируса, цитокиновые ответы и другие аспекты [Esteban и Buller, 2005].

Чтобы обеспечить отбор группоспецифических антител, проводили только два раунда обогащения иммунной комбинаторной библиотеки антителами против вируса экстремелии. Такой прием повышает вероятность отбора группоспецифических антител, но снижает вероятность отбора высокоаффинных антител. После скрининга из обогащенной библиотеки было отобрано 5 антител, некоторые из них были группоспецифическими и были способны связывать и / или нейтрализовать несколько протестированных ортопоксвирусов.

Сравнение аминокислотных последовательностей отобранных антител с антителами, полученными ранее против ВОК и ВОВ, и направленных к белку р35 ортопоксвирусов показало, что сегменты Vh большинства нейтрализующих антител принадлежат к семейству VH3-9 (Таблица 7). Кроме того, в этих scFv

Таблица 7 – Классификация генов, кодирующих VH домены антител, отобранных против ВЭ, ВОК и ВОВ

AT	Vh		
	V	D	J
1A	V3-9	D6-6	J3
4H	V3-9	D6-6	J3
6H	V3-9	D6-6	J3
8H	V3-9	D6-6	J3
8E	V3-9	D6-6	J4
b9	V3-9	D6-6	J1
a4	V3-9	D6-6	J3
c4	V3-9	D6-6	J3
d2	V3-9	D6-6	J3
e7	V3-9	D6-6	J3
e8	V3-9	D6-6	J3
f6	V1-18	D6-6	J3
h1	V3-9	D6-6	J3
g11	V1-18	D2-21	J4
3VA10	V3-9	D6-6	J3

преимущественно присутствовали генные сегменты D6-6 и JH3. Преимущественный отбор VH-доменов со структурой VH3-9 / D6-6 / JH3 свидетельствует о том, что эти генные сегменты кодируют полипептидную структуру, которая оптимально соответствует иммунодоминантному родоспецифическому эпитопу белка p35 для тестируемых ортопоксвирусов. Смена этого паттерна VH3-9 / D6-6 / JH3 на паттерн VH3-9 / D6-6 / JH4 в VH-домене одноцепочечного антитела 8E привела к тому, что это антитело не было способно связывать ВОК. Преобладающее использование определенных генных сегментов, кодирующих человеческие антитела, специфичные к некоторым вирусным белкам, было показано и для других вирусов. В частности, антитела к белку VP7 ротавирусов в основном содержат домен VH1-46 [Weitkamp et

al., 2003], а антитела к домену V3 белка gp120 ВИЧ-1 преимущественно кодируются генными сегментами VH5-51, D2-15 и JH3 [Gorny et al., 2009]. Более того, Fab-фрагменты, отобранные против ВОВ из комбинаторной фаговой библиотеки, сконструированной на основе периферических лимфоцитов добровольцев, предположительно афроамериканцев, иммунизированных ВОВ, преимущественно содержали домен VH4-39, включая Fab-фрагменты специфичные к белку p35, и некоторые из них обладали вируснейтрализующей активностью [Schmaljohn et al., 1999]. Различия в преимущественном использовании V-сегментов у анти-p35-нейтрализующих антител, согласно опубликованным и нашим данным, могут быть объяснены, с одной стороны, наличием двух отдельных нейтрализующих эпитопов в белке p35 и, с другой, индивидуальными иммуногенетическими особенностями привитых добровольцев.

На основании последовательности третьего гипервариабельного участка тяжелой цепи (CDR3H) антитела из нашей библиотеки могут быть разделены на 3 группы. Одно из отобранных фаговых антител, 8E, не распознавало ВОК и не нейтрализовало ВНО. Последовательность V_H домена антитела 8E обладала значительным сходством с антителами 1 группы, за исключением двух ако в CDR2, одного – в третьем каркасном регионе, и трех – в CDR3. CDR3 V_H домена антитела 8E имеет последовательность DGIAA-RRGYFDY, в которой можно выделить мотив, общий с CDR3 V_H доменов антител первой и второй групп. Однако ако аланина и изолейцина заменены на ако ароматического тирозина, что может повлиять на специфичность связывания антитела белком p35 ВОК. Кроме того, общий заряд всех гипервариабельных участков антитела 8E составляет 2+, в то время как для других антител – 3+ или 4+, это различие также может влиять на взаимодействие фагового антитела 8E с белком p35 ВНО и ВОК.

Все отобранные против ВЭ антитела, а также антитела, отобранные ранее против ВОК и ВОВ [Дубровская и Тикунова, 2007; Патент RU2005125994], были проверены по способности нейтрализовать инфекционность ВНО *in vitro*. Оказалось, что часть из них способны подавлять инфекционность вируса на культуре клеток Vero E6. Таким образом, была показана возможность отобрать несколько группоспецифических ВНО-нейтрализующих антител с использованием ВЭ в качестве антигена.

Все фаговые антитела, способные нейтрализовать вирусную активность ВНО, взаимодействовали с белком р35 ортопоксвирусов, что было показано методом вестерн-блот анализа. Белок р35 является белком оболочки зрелого внутриклеточного вируса (IMV) [Zhang and Moss, 1991; Lin et al., 2000; Davies et al., 2005]. Он способствует адсорбции вируса на поверхности клеток, участвует в вирусной инфекции и играет важную роль в сборке вирионов [Lin et al., 2000]. Белок р35 является иммуногенным для мышей и кроликов [Wilton и Gordon, 1986; Chelyarov et al., 1988; Housawi et al., 1998], и его введение может защитить мышей от смертельных доз ВОВ [Davies et al., 2005; Demkowicz et al., 1992; McCausland et al., 2010]. Показано, что для людей р35 – иммунодоминантный белок [Chelyarov et al., 1988; Zinoviev et al., 1994; Дубровская В.В. и др., 2007].

ОРТ, кодирующие белок р35, высоко консервативны среди ортопоксвирусов (Таблица 8), но при этом имеются некоторые различия у разных видов ортопоксвирусов (Таблица 9). Последовательность белка р35 составляет 324 аа для большинства ортопоксвирусов, и 325 аа для белка р35 ВНО. Следует отметить высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей этого белка. Так, степень гомологии белков р35 ВОВ, штамм Lister, и ВОК, штамм GRI-90, составляет 98,46% (5 замен), ВОВ и ВОО, штамм Zaire, – 93,83%, ВОВ и ВЭ – 96,6%, ВОК и ВОО – 95,37% (Таблицы 8, 9). Секвенированная в этой работе нуклеотидная последовательность ОРТ, кодирующего белок р35 (EMV085), ВЭ штамм K1, против которого были отобраны вируснейтрализующие антитела, совпала с таковой для ВЭ штамма Moscow.

После того, как были выявлены одноцепочечные антитела, способные нейтрализовать инфекционность ортопоксвирусов, включая ВОВ и ВОО, необходимо было определить вируснейтрализующий эпитоп белка р35. Для определения вируснейтрализующего эпитопа белка р35 использовали комбинацию двух методов: во-первых, были сконструированы рекомбинантные ортопоксвирусные белки р35, укороченные с N- и C-концов; во-вторых, для более детального картирования эпитопов был применен пептидный фаговый дисплей.

Таблица 8 – Сравнение аминокислотных замен в последовательностях белка р35 различных ортопоксвирусов

	ВОВ, Lister	ВОК, GRI-90	ВОО, Zaire	ВЭ, К1	ВНО, Ind-3А
ВОВ, Lister		98.457%	93.827%	96.605%	96,31%
ВОК, GRI-90	319 ако		95.370%	97.531%	96%
ВОО, Zaire	304 ако	309 ако		93.519%	93,23%
ВЭ, К1	313 ако	316 ако	303 ако		93,54%
ВНО, Ind-3А	313 ако	312 ако	303 ако	304 ако	

Таблица 9 – Конденсированное выравнивание аминокислотных последовательностей белка р35 различных ортопоксвирусов.

Позиция	3	4	4*	8	15	25	43	44	48	51	53	63	66	74	108	111	117
ВОВ, Lister	A	V	-	V	D	V	M	P	N	V	K	A	Q	N	N	T	K
ВОК, GRI-90	.	A	-	D	K	.	.
ВОО, Zaire	.	A	-	Q	D	I	N	V	.	D	K	I	N
ВЭ, К1	.	A	-	I	A	.	I	.	D	.	.	V	.	.	K	.	.
ВНО, Ind-3А	V	.	N	.	.	L	.	.	.	I	.	.	H	.	K	.	.

Позиция	123	124	143	168	171	173	198	216	223	230	233	247	251	263	265	274
ВОВ, Lister	I	V	M	M	N	A	I	I	M	L	A	Y	N	A	A	A
ВОК, GRI-90	D	H
ВОО, Zaire	.	I	I	I	D	M	S	H	T	V	.	T
ВЭ, К1	V	.	.	.	D	.	V	L
ВНО, Ind-3А	V	.	.	I	M	S	H	.	.	V	.

4* – ако, имеющийся только у ВНО

На основании третичной структуры белка р35, предложенной в теоретическом отделе ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», и предсказанных вероятных эпитопов белка р35, было создано 13 вариантов укороченного белка р35 ВОК. Неожиданно самый маленький белок, выявляемый нейтрализующими фаговыми антителами, оказался относительно большим и включал в себя 1–239 а.о. Дальнейшее укорочение этого белка с N- или C- концов приводило к тому, что белок переставал выявляться вируснейтрализующими антителами.

Второй метод картирования эпитопов, пептидный фаговый дисплей, был применен для более детального картирования вируснейтрализующего эпитопа. Для реализации этого метода необходимо было сконструировать полноразмерное антитело человека на основе VH- и VL-доменов фагового антитела 1A, которое продемонстрировало дозозависимую нейтрализацию ВНО, ВОВ и ВОК. В работе использовали две комбинаторные фаговые библиотеки случайных пептидов: 1) Ph.D.-12, представляющую собой популяцию бактериофагов, каждый из которых экспонирует на своей поверхности пептид из 12 а.о. в составе белка р3; и 2) Ph.D.-C7C, включающую 7-членные случайные пептиды, фланкированные парой остатков цистеина, на N-конце минорного белка р3 бактериофага. Для отбора бактериофагов, несущих на своей поверхности пептиды, имитирующие эпитопы белка р35, использовали популяции бактериофагов после третьего раунда аффинной селекции. Из библиотеки Ph.D.-12 были отобраны девять различных пептидов, ни один из них не содержал последовательности, обладающие сходством с последовательностью белка р35. Вероятно, из этой библиотеки отобраны только так называемые пептиды-миметики. Из библиотеки Ph.D.-C7C было отобрано восемь пептидов, четыре из них включали в себя J3L-подобные последовательности. Полученные данные продемонстрировали, что эпитоп белка р35, узнаваемый нейтрализующими антителами, является прерывистым, и в связывании, вероятно, участвуют а.о. в областях 15–19 на петле ¹³VIDRLPSETFPNVHENINDQKF³⁴ и 232–237 на петле ²³¹DNAAKYVEN²³⁹.

Примечательно, что выбранные мотивы не совпадали с предполагаемыми ранее сайтами связывания гликозаминогликана (GAG), соответствующими 94–101 и 159–164 а.о. [Lin et al., 2000]. GAG-связывающие сайты белка р35 ответственны за связывание с молекулами гепарансульфата, экспонированными на поверхности

многих типов эукариотических клеток, и было высказано предположение, что они опосредуют адсорбцию вируса на гепарансульфате клеточной поверхности во время вирусной инфекции [Lin et al., 2000]. Эти мотивы имеют консенсусную последовательность гликозаминогликан-связывающего мотива – X-B-B-X-X-B-X и X-B-B-X-B-X, где B-основный асо, а X – неполярный асо. Принимая во внимание функциональную важность этих гепаран-связывающих мотивов для инфицирования клетки, можно было бы предположить, что эпитоп/эпитопы р35, узнаваемые вируснейтрализующими антителами, должны быть ассоциированы с этими мотивами. Однако в отобранных пептидах эти гепаран-связывающие мотивы выявлены не были. Есть два возможных объяснения того, почему р35-специфические нейтрализующие антитела, отобранные в этом исследовании, скорее всего, не распознают сайты связывания GAG. Первое объяснение состоит в том, что в белке р35 имеются другие эпитопы, которые могут обеспечивать адсорбцию ортопоксвирусной частицы на клетке-хозяине. Второе объяснение, состоит в том, что исследуемые антитела нейтрализуют вирус, не ингибируя адсорбцию вируса при взаимодействии сайтов связывания GAG с клеточными рецепторами. Если первая гипотеза верна, вирионы могут связывать не только GAG на клеточной поверхности во время вирусной инфекции. Если вторая гипотеза верна, то предполагаем, что отобранные фаговые антитела и полноразмерные человеческие антитела нейтрализуют инфекционность ортопоксвирусов, участвуя в дестабилизации структуры IMV или агрегации вирионов. Дальнейший структурный анализ взаимодействий между выбранными нейтрализующими антителами и картированным прерывистым эпитопом может подтвердить или опровергнуть предположения.

Использование иммуногенов поверхностной мембраны и оболочки вируса в составе одной вакцины способствует формированию одновременного иммунного ответа против двух инфекционных форм вируса – IMV и EEV, и обеспечивает надежную защиту против ортопоксвирусов [Hooper et al., 2004]. Одним из таких подходов к вакцинопрофилактике оспы, является разработка поливалентной ДНК-вакцины на основе смеси рекомбинантных плазмид, содержащих гены пяти вирионных белков ВНО под контролем промотора цитомегаловируса. Три из них, A30L (A27L BOB), F8L (D8L BOB), M1R (L1R BOB), входят в состав поверхностной

мембраны внутриклеточных вирионов (IMV), другие два, A36R (A33L BOB) и B7R (B5R BOB), расположены на оболочке внеклеточной формы вируса (EEV). Такая поливалентная ДНК-вакцина вызывала наработку вируснейтрализующих антител и обеспечивала полную защиту мышей от инфицирования ВЭ в дозе 10 LD₅₀ при трехкратной внутрикожной иммунизации [Максютов и Щелкунов, 2010, 2011; Maksyutov R.A. et al., 2013]. Поскольку белок Н3L поверхностной мембраны IMV является иммунодоминантным [Chelyarov et al., 1988; Zinoviev et al., 1994; Дубровская В.В. и др., 2007], было проведено исследование его способности индуцировать наработку вируснейтрализующих антител у мышей.

В нашем исследовании один из сконструированных рекомбинантных белков - р35Δ12, содержащий с 1 по 239 аао белка р35 ВОК, продемонстрировал способность при введении в мышей индуцировать у них образование антител, которые узнают клетки, зараженные ВОВ. Кроме того, сыворотки этих мышей способны нейтрализовать инфекционность ВОВ ЛИВП-GFP, в экспериментах *in vitro*. Исследование иммунологических свойств рекомбинантного полноразмерного белка р35 осповакцины проводили и ранее [Lin et al. 2000; Davies et al. 2005]. Полученные от иммунизированных животных сыворотки также обладали вируснейтрализующими свойствами. Однако в нашей работе белок р35 использовали для иммунизации в дозировках на порядок меньше, чем в указанных работах. Следует отметить, что даже так называемая короткая схема иммунизации – двукратное введение рекомбинантного белка р35 в низкой дозировке, – обеспечила индукцию вируснейтрализующих антител. Проведенные эксперименты продемонстрировали высокую иммуногенность белка р35Δ12 и целесообразность его возможного использования в качестве компонента субъединичной вакцины или использовании ОПТ Н3L, кодирующей р35, при разработки ДНК-вакцины. На структуру этого белка получен патент РФ RU2511037. Вместе с тем, требуются дальнейшие детальные исследования *in vivo* для оценки протективных свойств белка р35Δ12 и предпочтительных схем иммунизации, обеспечивающих защиту мышей от ортопоксвирусных инфекций.

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 переменным нейтрализующим 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 р35 Δ 12, способный вызывать при иммунизации мышей выработку антител, обладающих вируснейтрализующими свойствами. Дальнейшие исследования протективных свойств этого белка *in vivo* позволят сделать заключение о целесообразности использования этого белка или кодирующего гена в разработку 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, отобранные 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 p35 в составе вирионов вирусов оспы коров, осповакцины и экстремелии, а также с рекомбинантным белком p35 вируса оспы коров.

4. Созданы суспензионные линии клеток, стабильно продуцирующие полноразмерные антитела человека fh1A и fh8E, которые специфически взаимодействуют с ортопоксвирусами и способны нейтрализовать инфекционность вируса осповакцины на культуре клеток *Vero E6*.

5. Получены штаммы *Escherichia coli*, продуцирующие укороченные варианты белка p35 вируса оспы коров, штамм Гришак, β -Gal-p35 Δ 1 – β -Gal-p35 Δ 13, и показано, что вируснейтрализующие антитела 1А, 4Н, 6Н, fh1A и fh8E специфически взаимодействуют с белком β -Gal-p35 Δ 12, содержащим с 1 по 239 аминокислотные остатки белка p35. 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 ¹³VIDRLPSETFPNVHENINDQKF³⁴ и ²³¹DNAAKYVEN²³⁹, соответственно.

6. Установлено, что иммунизация мышей рекомбинантным белком p35 Δ 12 приводит к наработке вируснейтрализующих антител.

Список сокращений

АГ – антиген

ако – аминокислотный остаток

АТ – антитело

БСА – бычий сывороточный альбумин

БОЕ (б.о.е.) – бляшкообразующая единица

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВНО – вирус натуральной оспы

ВОО – вирус оспы обезьян

ВОВ – вирус осповакцины

ВОК – вирус оспы коров

ВЭ – вирус экстремелии

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСН – додецилсульфат натрия

ИПТГ – изопропил- β -D-тиогалактопиранозид

ИФА – иммуноферментный анализ

кДа – килодальтон

к.о.е. – колониеобразующая единица

МКА – моноклональное антитело

ОРТ – открытая рамка трансляции

оц-АТ, scFv – одноцепочечное антитело

ПААГ – полиакриламидный гель

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РНК – рибонуклеиновая кислота

Трис – трис-(гидроксиметил)аминометан

ФСБР – фосфатно-солевой буферный раствор

ХАО КЭ – хорион аллантоисные оболочки растущих куриных эмбрионов

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

CDR – гипервариабельные фрагменты антител

CEV – клеточно-ассоциированный оболочечный вирион
CR – мембранные полумесяцы
DAPI-4,6-диамидино-2-фенилиндол
DMSO – диметилсульфоксид
DTT – дитиотреитол
dNTP – дезоксинуклеотид-5`-трифосфаты
EEV – внеклеточный оболочечный вирион
FR – каркасный фрагмент вариабельного домена антитела
Ig – иммуноглобулин
IEV – зрелый внутриклеточный вирион с двумя дополнительными оболочками
IMV – зрелый внутриклеточный вирион
IV – незрелая форма вириона
MOPS – 3-[N-морфолино]пропансульфоновая кислота
pNPP – пара-нитрофенилфосфат
TEMED – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамид
TIR – инвертированные концевые повторы
Vero – эмбриональные клетки почек зеленой мартышки
VIG – сывороточный вакцинный иммуноглобулин
VH – вариабельный домен тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина
VL – вариабельный домен легкой цепи молекулы иммуноглобулина
X-gal – 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозид

Список литературы

1. Батанова, Т.А. Создание и характеристика наивной комбинаторной библиотеки одноцепочечных антител человека / Т.А. Батанова, А.Б. Улитин, В.В. Морозова, А.Г. Ламан, Е.В. Жираковская, В.В. Воронина, Ф.А. Бровко, Н.В. Тикунова // Мол. ген. вирусол. микробиол. – 2006. – Т. 3. – С. 35-41.
2. Деев, С. Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения / С. Деев и Е. Лебедеенко // Acta Naturae. – 2009. – Т.1. – С. 32-50.
3. Дубровская, В.В. Получение одноцепочечных антител человека к основному иммунодоминантному белку ортопоксвирусов / В.В. Дубровская, Н.В. Тикунова // Вестник НГУ. – 2007. – Т. 5. – №1. – С. 100-105.
4. Дубровская, В.В. Конструирование комбинаторной иммунной клонотекы одноцепочечных антител человека против ортопоксвирусов и селекция из нее антител к рекомбинантному белку рга301 вируса натуральной оспы / В.В. Дубровская, А.Б. Улитин, А.Г. Ламан, И.П. Гилева, Н.И. Бормотов, А. А. Ильичев, Ф. А. Бровко, С. Н. Щелкунов, Е. Ф. Беланов, Н. В. Тикунова // Мол. биология. – 2007. – Т. 41. – №1. – С. 173-185.
5. Максютлов, Р.А. Оптимизация ДНК-вакцины против ортопоксвирусных инфекций человека на основе гена F8L вируса натуральной оспы / Р.А. Максютлов, С.Н Щелкунов // Российский Иммунологический Журнал. – 2010. – Т. 4. – № 1. – С. 25-32.
6. Максютлов, Р.А. Сравнение протективных свойств противооспенной ДНК-вакцины на основе гена A30L вируса натуральной оспы и его варианта с измененным кодоновым составом / Р.А. Максютлов, С.Н Щелкунов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2011. – № 2. – С. 30-34
7. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Молекулярное клонирование, 1984. – 477 с.
8. Маренникова, С.С. Патогенные для человека ортопоксвирусы / С.С. Маренникова, С.Н. Щелкунов. – М.: КМК Scientific Press Ltd., 1998. – 386 с.

9. Остерман, Л.А., Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование / Л.А.Остерман. – М.: Наука, 1981. – 287 с.
10. Патент RU2005125994 [Комбинаторная фагмидная библиотека одноцепочечных антител человека, обогащенная антителами против вируса осповакцины, рекомбинантная фагмидная ДНК рHEN-2A8, содержащая уникальный ген одноцепочечного антитела человека, способного нейтрализовать вирус осповакцины и вирус оспы коров, и искусственное одноцепочечное антитело человека 2A8, способное нейтрализовать вирус осповакцины и вирус оспы коров]: пат. RU 2005125994 Рос.Федерация: МПК C12Q 1/68 / Дубровская В.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное унитарное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека". – RU2005125994/13A ; заявл. 15.08.2005 ; опубл. 10.03.07, Бюл. № 7.
11. Петров, И.С. Противоопухолевое действие рекомбинантного вируса осповакцины LIVP-GFP / И.С. Петров, Е.П. Гончарова, И.В. Колосова, С.Г. Поздняков, С.Н. Щелкунов, М.А. Зенкова, В.В. Власов // Докл. Акад. Наук. – 2013. – 451(5) . – С. 592-597.
12. Ройт А. Иммунология / Ройт А. – М.: Логосфера, 2007. – 568 с.
13. Юн, Т.Э. Полноразмерное рекомбинантное антитело человека против вируса осповакцины / Т.Э. Юн, Н.В. Тикунова, Л.Н. Шингарова, Т.К. Алиев, Е.Ф. Болдырева, В.В. Морозова, А.А. Швалов, О.В. Некрасова, И.В. Польшалова, А.А. Панина, А.А. Ильичев, М.П. Кирпичников, Л.С. Сандахчиев // Докл. РАН. – 2006. – 407. – С. 98-101.
14. Albert, L.J. Molecular mimicry and autoimmunity / L.J. Albert, R.D. Inman // New England J Med. – 1999. – V. 341. – P. 2068-2074.
15. Aldaz-Carroll, L. Epitope-mapping studies define two major neutralization sites on the vaccinia virus extracellular enveloped virus glycoprotein B5R / L. Aldaz-Carroll, J.C. Whitbeck, M. Ponce de Leon, H. Lou, L. Hirao, S.N. Isaacs, B. Moss, R.J. Eisenberg, G.H. Cohen // J Virol. – 2005a. – V. 79(10). – P. 6260-6271.

16. Alkhalil, A. Inhibition of Monkeypox virus replication by RNA interference / A. Alkhalil, A. Strand, E. Mucker, J.W. Huggins, P.B. Jahrling, S.W. Ibrahim // *Virol. J.* – 2009. – V. 6. – P. 188–198.
17. Alt, F. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments / Alt, F. W., Yancopoulos, G. D., Blackwell, T. K., C. Wood, E. Thomas, M. Boss, R. Coffman, N. Rosenberg, S. Tonegawa, D. Baltimore. // *The EMBO Journal.* – 1984. – 3. – P. 1209–1219.
18. Altschul, S.F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – V.25. – P.3389-3402.
19. Andersen, P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* I infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins / P.Andersen // *Infect. Immun.* – 1994. – V. 62. – P. 2536-2544.
20. Atassi, M. Z. Antigenic structure of proteins / M.Z. Atassi // *Eur J. Biochem.* – 1984. – V. 145. – P. 1-20.
21. Atassi, M.Z. Conformational studies on modified proteins and peptides: IV. Conformation of lysozyme derivatives modified at tyrosine or at tryptophan residues / M.Z. Atassi, M.T. Perlstein, A.F. Habeeb // *J. Biol. Chem.* – 1971. – V. 246. – P. 3291-3296.
22. Atassi, M.Z. Immunochemistry of sperm whale myoglobin: I. The specific interaction of some tryptic peptides and of peptides containing all the reactive regions of the antigen / M.Z. Atassi, B.J. Samplin // *Biochemistry* – 1968. – V. 7. – P. 688-698.
23. Atassi, M.Z. Immunochemistry of sperm whale myoglobin: 8. Specific interaction of peptides obtained by cleavage at proline peptide bonds / M.Z. Atassi, R.P. Singhal // *Biochemistry.* – 1970. – V. 9. – P. 3854-3861.
24. Babai, I. A novel influenza subunit vaccine composed of liposome-encapsulated haemagglutinin/neuraminidase and IL-2 or GM-CSF. I: vaccine characterization and efficacy studies in mice / I. Babai, S. Samira, Y. Barenholz // *Vaccine.* – 1999. – V. 17 – P. 1223-1238.

25. Baer, R. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome / R. Baer, A.T. Bankier, M.D. Biggin, P.L. Deininger, P.J. Farrell, T.J. Gibson, G. Hatfull, G.S. Hudson, S.C. Satchwell, C. Seguin // *Nature*. – 1984. – V. 310(5974). – P. 207-211.
26. Baker, R.O. Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections / R.O. Baker, M. Bray, J.W. Huggins // *Antiviral. Res.* – 2003. – V. 57. – P. 13–23.
27. Bahadir, AO. Phage displayed HBV core antigen with immunogenic activity / AO Bahadir, BK Balcioglu, KS Uzyol, I Hatipoglu, I Sogut, A Basalp, B. Erdag // *Appl Biochem Biotechno.* – 2011. – 165. – P. 1437–1447.
28. Barbas, C.F. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: The gene III site / C.F. Barbas 3rd, A.S. Kang, R.A. Lerner, S. Benkovic // *J.Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1991. – 88. – P. 7978–7982.
29. Barbas, C.F. Semi synthetic combinatorial libraries: A chemical solution to the diversity problem / Barbas, C. F., Bain, J. D., Hoekstra, D. M., Lerner, R. // *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*. – 1992. – 89. – P. 4457–4461.
30. Barlow, D. J. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants / D. J. Barlow, M. S. Edwards, J. M. Thornton // *Nature*. – 1986. – V. 322. – P. 747-748.
31. Baykov, I.K. A protective chimeric antibody to tick-borne encephalitis virus / I.K. Baykov, A.L. Matveev, O.V. Stronin, A.B. Ryzhikov, L.E. Matveev, M.F. Kasakin, V.A. Richter, N.V. Tikunova // *Vaccine*. – 2014. – 32. – P. 3589-3594.
32. Beerli, R.R. Mining human antibody repertoires / R.R Beerli, C. Rader // *MAbs*. – 2010. – 2. – P. 365–378.
33. Benhar, I. Design of synthetic antibody libraries / I. Benhar // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2007. – 7. – P. 763–779.
34. Benhnia, M.R., Redundancy and Plasticity of Neutralizing Antibody Responses Are Cornerstone Attributes of the Human Immune Response to the Smallpox Vaccine / M.R.Benhnia, M.M. McCausland, Su Hua-Poo, K. Singh, J. Hoffmann, D.H. Davies, P.L. Felgner, S Head., A. Sette, D.N. Garboczi, S. Crotty // *Journal of Virology*. – 2008. – V. 82. – N. 7. – P. 3751-3768.

35. Berzofsky, J.A. Immunogenicity and antigen structure, in *Fundamental Immunology* (Paul, W. E., ed.) / J.A. Berzofsky, I.J. Berkower. – Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2003. – P. 631 – 683.
36. Birnboim, H.C. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA / H.C. Birnboim, J. Doly // *Nucleic Acids Res.* – 1979. – V. 7. – P. 1513-1523.
37. Bogdanos, D.P. Molecular mimicry and autoimmune liver disease: virtuous intentions, malign consequences / D.P. Bogdanos, K. Choudhuri, D. Vergani // *Liver.* – 2001. – V. 21 – P. 225-232.
38. Boyle, K. Poxviruses, In *Viral Genome Replication* (C.E.Cameron ed.) / K. Boyle and P. Traktman – NY: Springer US, 2009. – P.225-247.
39. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – V.72. – P. 248-254.
40. Braunagel, M. Construction of a semisynthetic antibody library using trinucleotide oligos / M. Braunagel and M. Little // *Nucleic Acids Res.* - 1997. - V.25. - P.4690-4691.
41. Burritt, J.B. Topological mapping of neutrophil cytochrome b epitopes with phage-display libraries / J.B. Burritt, M.T. Quinn, M.A. Jutila, C.W. Bond, A.J. Jesaitis // *J. Biol. Chem.* – 1995. – 270. – P. 16974–16980.
42. Carter, G.C. Vaccinia virus cores are transported on microtubules / G.C. Carter, G. Rodger, B.J. Murphy, M. Law, O. Krauss, M. Hollinshead and G.L. Smith // *Journal of General Virology.* – 2003 – V. 84. – P. 2443–2458.
43. Chelyapov, N.V. Analysis of antibody production to vaccinia virus in man and rabbits in response to inoculation of a recombinant vaccinia-hepatitis B vaccine / N.V. Chelyapov, Chernos V.I., Andzhaparidze O.G. // *Vopr. Virusol.* – 1988. – 33. – P. 175-179.
44. Chen, Z. Characterization of Chimpanzee/Human Monoclonal Antibodies to Vaccinia Virus A33 Glycoprotein and Its Variola Virus Homolog In Vitro and in a Vaccinia Virus Mouse Protection Model / Z. Chen, P. Earl, J. Americo, I. Damon, S.K. Smith, F. Yu, A. Sebrell, S. Emerson, G. Cohen, R.J. Eisenberg, I. Gorshkova,

- P. Schuck, W. Satterfield, B. Moss, R. Purcell // *J Virol.* – 2007. – V. 81(17). – P. 8989-8995.
45. Cherf, G.M. Applications of yeast surface display for protein engineering / G.M. Cherf, J.R. Cochran // *Methods in Molecular Biology.* – 2015. – 1319. – P. 155–175.
46. Chung, C.S. Vaccinia virus proteome: identification of proteins in vaccinia virus intracellular mature virion particles / C.S. Chung, C.H. Chen, M.Y. Ho, C.Y. Huang, C.L. Liao, W. Chang // *Journal of Virology.* – 2006. – V. 80 (5). – P.2127-2140.
47. Chung, C.S. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate / C.S. Chung, J.-C. Hsiao, Y.-S. Chang, W. Chang // *J. Virol.* – 1998. –V. 72. – P. 1577–1585.
48. Condit, R.C. In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion / R.C. Condit, N. Moussatch, and P. Traktman // *Advances in Virus Research.* 2006. – V.66. – P. 31–124.
49. Cortese, R. Selection of biologically active peptides by phage-display of random peptide libraries / R. Cortese, P. Monaci, A.C. Luzzago, F. Bartoli, I. Cortese, P. Fortugno, G. Galfrè, A. Nicosia, and F. Felici // *Curr. Opin. Biotech.* – 1996. – V. 7, - P. 616 – 621.
50. Crotty, S. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination / S. Crotty, P. Felgner, H. Davies, J. Glidewell, L. Villarreal, R. Ahmed // *J. Immunol.* – 2003. – V. 171. – P. 4969-4973.
51. Cwirla, S.E. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands / S.E. Cwirla, E.A. Peters, R.W. Barrett, and W.J. Dower // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – V. 87. – P. 6378 – 6382.
52. Davies, D.H. Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: high-throughput vaccine and diagnostic antigen discovery / D.H. Davies, X. Liang, J.E. Hernandez, A. Randall, S. Hirst, Y. Mu, K.M. Romero, T.T. Nguyen, M. Kalantari-Dehaghi, S. Crotty, P. Baldi, L.P. Villarreal, P.L. Felgner // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2005a. – V.102 (3). – P. 547 –552.
53. Davies, D.H. Vaccinia virus H3L envelope protein is a major target of neutralizing antibodies in humans and elicits protection against lethal challenge in mice / D.H. Davies, M.M. McCausland, C. Valdez, D. Huynh, J.E. Hernandez, Y. Mu, S.

- Hirst, I L. Villarrea, P.L. Felgner, y S. Crott // *J Virol.* – 2005b. – V. 79. – P. 11724-11733.
54. Davies, D.H. Proteome-wide analysis of the serological response to vaccinia and smallpox / D.H. Davies, D.M. Molina, J. Wrammert, J. Miller, S. Hirst, Y. Mu, J. Pablo, B. Unal, R. Nakajima-Sasaki, X. Liang, S. Crotty, K.L. Karem, I.K. Damon, R. Ahmed, L. Villarreal, P.L. Felgner // *Proteomics.* – 2007. – V. 7 (10). – P. 1678 –1686.
55. Davies, D.H. Antibody profiling by proteome microarray reveals the immunogenicity of the attenuated smallpox vaccine modified vaccinia virus ankara is comparable to that of Dryvax / D.H. Davies, L.S. Wyatt, F.K. Newman, P.L. Earl, S. Chun, J.E. Hernandez, D.M. Molina, S. Hirst, B. Moss, S.E. Frey, P.L. Felgner // *J. Virol.* – 2008. – V. 82 (2). – P. 652 – 663.
56. Davies, D.H. T cell antigen discovery using soluble vaccinia proteome reveals recognition of antigens with both virion and nonvirion association / S. Chun, G. Hermanson, J.A. Tucker, A. Jain, R. Nakajima, J. Pablo, P.L. Felgner, X. Liang. // *J Immunol.* – 2014. – 193(4). – P. 1812-27.
57. De Groot, A.S. Immunome-derived vaccines / A.S. De Groot // *Expert. Opin. Biol. Ther.* – 2004. – 4. – P. 767–772.
58. Demkovicz, W. Identification and characterization of Vaccinia virus genes encoding proteins that are highly antigenic in animals and are immunodominant in vaccinated humans / W. Demkovicz, J. Maa, M. Esteban // *J. Virol.* – 1992. – V. 66. – P. 386-398.
59. DeLange, A.M. The role of telomeres in poxvirus DNA replication / A.M. DeLange, n G. McFadde // *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 1990. – V.163. – P.71–92.
60. Deramchia, K. In vivo phage display to identify new human antibody fragments homing to atherosclerotic endothelial and subendothelial tissues / K. Deramchia, M. J. Jacobin-Valat, A. Vallet, H. Bazin, X. Santarelli, S. Sanchez, P. Dos Santos, J.M. Franconi, S. Claverol, S. Bonetto, G. Clofent-Sanchez // *The American Journal of Pathology.* – 2012. – 180(6). – P. 2576–2589.

61. Derrien, M. Tyrosine phosphorylation of A17L during vaccinia virus infection: involvement of the H1 phosphatase and the F10 kinase / M. Derrien, A. Punjabi, R. Khanna, O. Grubisha, P. Traktman // *J. Virol.* 1999. – V. 73. – P. 7287–7296.
62. Devlin, J.J. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules / J.J. Devlin, L.C. Panganiban, P.E. Devlin // *Science.* – 1990. – V. 249. – P. 404 – 406.
63. Dotto, G.P. The functional origin of bacteriophage f1 DNA replication. Its signals and domains / G.P. Dotto, K. Horiuchi and N.D. Zinder // *J. Mol. Biol.* – 1984. – V. 172. – P. 507-521.
64. Du, S. Vaccinia virus DNA replication: two hundred base pairs of telomeric sequence confer optimal replication efficiency on minichromosome templates / S. Du and P. Traktman // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* – 1996. – V. 93. – P.9693–9698.
65. Du Plessis, D.H. Fine mapping of a continuous epitope on VP7 of Bluetongue Virus using overlapping synthetic peptides and a random epitope library / D.H. Du Plessis, L.-E. Wang, E.A. Jordaan, and B.T. Eaton // *Virology.* – 1994. – V. 198. – P. 346–349.
66. Earl, P.L. Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox / P.L. Earl, J.L. Americo, L.S. Wyatt, L.A. Eller, J.C. Whitbeck, G.H. Cohen, R.J. Eisenberg, C.J. Hartmann, D.L. Jackson, D.A. Kulesh, M.J. Martinez, D.M. Miller, E.M. Mucker, J.D. Shamblin, S.H. Zwiers, J.W. Huggins, P.B. Jahrling and B. Moss // *Nature.* – 2004. – V. 428. – P. 182–185.
67. Engelstad, M. A constitutively expressed vaccinia gene encodes a 42-kDa glycoprotein related to complement control factors that forms part of the extracellular virus envelope / M. Engelstad, S.T. Howard, G.L. Smith // *Virology.* – 1992. – V. 188. – P. 801–810.
68. Engelstad M. The vaccinia virus 42 kDa envelope protein is required for the envelopment and egress of extracellular virus and virus virulence / M. Engelstad, G. Smith // *Virology.* – 1993. – V. 194. – P. 627-637.
69. Enshell-Seijffers, D. The rational design of a ‘type 88’ genetically stable peptide display vector in the filamentous bacteriophage fd / D. Enshell-Seijffers, L. Smelyanski, J. M. Gershoni // *Nucleic Acids Research.* – 2001. – 29. – P.50.

70. Enshell-Seijffers, D. The mapping and reconstitution of a conformational discontinuous B-cell epitope of HIV-1 / D. Enshell-Seijffers, D. Denisov, B. Groisman, L. Smelyanskim, R. Meyuhas, G. Gross, G. Denisova, J.M. Gershoni // *J. Mol. Biol.* – 2003. – 334. – P. 87–101.
71. Essani, K. Biogenesis of vaccinia: evidence for more than 100 polypeptides in the virion / K. Essani, S. Dales // *Virology.* – 1979. – V. 95. – P. 385-394.
72. Esteban, D.J. Ectromelia virus: the causative agent of mousepox / D.J. Esteban, R.M. Buller // *J Gen Virol.* – 2005. – 86. – P.2645–2659.
73. Ewert, S. Biophysical properties of human antibody variable domains / S. Ewert, T. Huber, A. Honegger, A. Plückthun // *J. Mol. Biol.* – 2003. – V. 325. – P. 531-553.
74. Fenner, F. The Orthopoxviruses / F. Fenner, R. Wittek, K. Dumbell – Acad.Press., USA, 1989. – P. 432.
75. Fenner, F. Smallpox and its eradication / F. Fenner, D.A. Henderson, I. Arita, A. Jezek, I.D. Ladnyi // World Health Organization, Geneva. – 1988.
76. Flexner, C. Prevention of vaccinia virus infection in immunodeficient mice by vector-directed IL-2 expression / C. Flexner, A. Hugin, B. Moss // *Nature.* – 1987. – V. 330. – P. 259-262.
77. Franke, C. Fatty acylation of vaccinia virus proteins / C. Franke, P. Reynolds, D. Hruby // *Virology.* – 1989. – V. 63. – P. 4285–4291.
78. Fogg, C. Protective immunity to vaccinia virus induced by vaccination with multiple recombinant outer membrane proteins of intracellular and extracellular virions / C. Fogg, S. Lustig, J.C. Whitbeck, R.J. Eisenberg, G.H. Cohen, B. Moss // *J. Virol.* – 2004. – V. 78(19). – P. 10230-10237.
79. da Fonseca, F.G. Effects of deletion or stringent repression of the H3L envelope gene on vaccinia virus replication / F.G. da Fonseca, E.J. Wolffe, A. Weisberg, B. Moss // *J. Virol.* – 2000. – V. 74. – P. 7518-7528.
80. Frenzel, A. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy /, A. Frenzel, T. Schirrmann, M. Hust // *MAbs.* – 2016. – 8. – P. 1177–1194.
81. Froehler B.C. Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates / B.C. Froehler, P.G. Ng, M.D. Matteucci // *Nucleic Acids Res.* – 1986. – V. 14. – P. 5399-5407.

82. Galmiche, M. Neutralizing and protective antibodies directed against Vaccinia virus envelope antigens / M. Galmiche, J. Goenaga, R. Wittek, L. Rindisbacher // *Virology*. – 1999. – V. 254. – P. 71-80.
83. Geysen, H.M. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant / H.M. Geysen, S.J. Rodda, T.J. Mason // *Mol. Immunol.* – 1986. – V. 23. – P.709 – 715.
84. Goebel, S.J. The complete DNA sequence of vaccinia virus / S.J. Goebel, G.P. Johnson, M.E. Perkus, S.V. Davis, J.P. Winslow, E. Paoletti // *Virology*. – 1990. – V. 179. – P. 241-266.
85. Goldsby, R.A. Immunology, 5th ed. / Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A., Kuby J. – WH Freeman and Company, New York, NY, 2002. – 603 P.
86. Gorny, M.K. Preferential use of the VH5-51 gene segment by the human immune response to code for antibodies against the V3 domain of HIV-1 / M.K. Gorny, X.H. Wang, C. Williams, B. Volsky, K. Revesz, B. Witover, S. Burda, M. Urbanski, Ph. Nyamby, Ch. Krachmarov, A. Pinter, S. Zolla-Pazner, A. Nadas. // *Mol. Immunol.* – 2009. – 46. – P. 917–926.
87. Graus, Y.E. Human anti-nicotinic acetylcholine receptor recombinant Fab fragments isolated from thymus-derived phage display libraries from myasthenia gravis patients reflect predominant specificities in serum and block the action of pathogenic serum antibodies / Y.E. Graus, M.H. de Baets, P.W. Parren, S. Berrih-Aknin, J. Wokke, P.J. van Breda Vriesman, D.R. Burton // *The Journal of Immunology*. – 1997. – 158(4). – P. 1919–1929.
88. Griffiths, A. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires / A. Griffiths, S. Williams, O. Hartley, I.M. Tomlinson, P. Waterhouse, W.L. Crosby, R.E. Kontermann, P.T. Jones, N.M. Low, T.J. Allison // *EMBO J.* – 1994. – V.13. – P.3245-3260.
89. Grosenbach, D. Identification and analysis of vaccinia virus palmitoylproteins / D. Grosenbach, S. Hansen, D. Hruby // *Virology*. – 2000. – V. 275. – P. 193-206.
90. Halperin I. SiteLight: binding-site prediction using phage display libraries / I. Halperin, H. Wolfson, R. Nussinov // *Protein Sci.* – 2003. – 12. – P. 1344–1359.
91. Hamidon, N.H. Immune TB antibody phage display library as a tool To study B cell immunity in TB infections. / N.H. Hamidon, S. Suraiya, M.E. Sarmiento, A. Acosta,

- M.N. Norazmi, T.S. Lim // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2018. – 184(3). – P. 852–868.
92. Hammers, C. M. Antibody phage display: Technique and applications / C.M. Hammers, J.R. Stanley // *The Journal of Investigative Dermatology*. – 2014. – 134. – P. 1–5.
93. He, X.Y. Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin // X.Y. He, Z. Xu, J. Melrose, A. Mullowney, M. Vasquez, C. Queen, V. Vexler, C. Klingbeil, M.S. Co, E.L. Berg. // *The Journal of Immunology*. – 1998. – 160. – P. 1029–1035.
94. Heljasvaara, R. The major core protein P4a (A10L gene) of Vaccinia virus is essential for correct assembly of viral DNA into the nucleoprotein complex to form immature viral particles / R. Heljasvaara, D. Rodriguez, C. Risco, J. Carrascosa, M. Esteban, J. Rodriguez // *J. Virol.* – 2001. – V. 75. – P. 5778-5795.
95. Ho, M. In vitro antibody evolution targeting germline host spots to increase activity of an anti-CD22 immunotoxin / M. Ho, R.J. Kreitman, M. Onda, I. Pastan // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – 280. – P. 607–617.
96. Hollinshead, M. Vaccinia virus utilises microtubules for movement to the cell surface / M. Hollinshead, G. Rodger, H. Van Eijl, M. Law, R. Hollinshead, D.J. Vaux, G.L. Smith. // *J. Cell. Biol.* – 2001. – V. 154. – P. 389–402.
97. Hoogenboom, H.R. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: Methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains / H.R. Hoogenboom, A.D. Griffiths, K.S. Johnson, D.J. Chiswell, P. Hudson, G. Winter. // *Nucleic Acids Research*. – 1991. – 19(15). – P. 4133–4137.
98. Hoogenboom, H.R. Selecting and screening recombinant antibody libraries / Hoogenboom, H.R. // *Nature Biotechnology*. – 2005. – 23. – P. 1105–1116.
99. Hooper, J.W. Smallpox DNA vaccine protects nonhuman primates against lethal monkeypox / J.W. Hooper, E. Thompson, C. Wilhelmsen, M. Zimmerman, M.A. Ichou, S.E. Steffen, C.S. Schmaljohn, A.L. Schmaljohn, P.B. Jahrling // *J Virol.* – 2004. – V. 78. – P. 4433-4443.
100. Hopkins, R.J. Clinical efficacy of intramuscular vaccinia immune globulin: a literature review / R.J. Hopkins, J.M. Lane // *Clin. Infect. Dis.* – 2004. – V. 39. – P. 819–826.

101. Housawi, F.M. The reactivity of monoclonal antibodies against orf virus with other parapoxviruses and the identification of a 39 kDa immunodominant protein / F.M.Housawi, G.M. Roberts, J.A. Gilray, I. Pow, H.W. Reid, P.F. Nettleton, K.J. Sumption, M.H. Hibma, A.A. Mercer // *Arch. Virol.* – 1998. – 143. – P. 2289-2303.
102. Hsiao, J.-C. Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells / J.-C. Hsiao, C.-S. Chung, W. Chang // *J. Virol.* – 1999. – V. 73. – P. 8750–8761.
103. Hutson, C.L. Comparison of West African and Congo Basin monkeypox viruses in BALB/c and C57BL/6 mice / C.L. Hutson, J.A. Abel, D.S. Carroll, V.A. Olson, Z.H. Braden, C.M. Hughes, M. Dillon, C. Hopkins, K.L. Karem, I.K. Damon, J.E. Osorio // *PLoS One.* – 2009. – V. 5 – P. 8912.
104. Ichihashi, Y. Epitope Mosaic on the Surface Proteins of Orthopoxviruses / Y. Ichihashi, M. Oie // *Virology.* – 1988. – V. 163. – P. 133-144.
105. Ichihashi, Y. Neutralizing epitope on penetration protein of vaccinia virus / Y. Ichihashi, M. Oie // *Virology.* – 1996. – V. 220. – P. 491-494.
106. Irving, M.B. Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics / M.B. Irving, O. Pan, J.K. Scott // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2001. – 5. – P. 314–324
107. Jameson, B.A. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants / B.A. Jameson, H. Wolf // *Computer Applications in the Biosciences Cabios.* –1988. – 4. – P. 181–186.
108. Joklik, W.K. The replication and coating of vaccinia DNA / W.K. Joklik and Y. Becker // *Journal of Molecular Biology.* – 1964. – V. 10. – P. 452–474.
109. Jones-Trower, A. Identification and preliminary characterization of vaccinia virus (Dryvax) antigens recognized by vaccinia immune globulin / A. Jones-Trower, A. Garcia, C.A. Meseda, Y. He, C. Weiss, A. Kumar, J.P. Weir and M. Merchlinsky // *Virology.* – 2005. – V. 343. – P.128-140.
110. Kaplon H. Antibodies to watch in 2019 / H. Kaplon, J.M. Reichert // *mAbs.* – 2019. – 11(2). – P. 219-238
111. Kay, B. Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual / B. Kay, G. Winter, J. McCafferty – NY.: Academic press, 1996. – 306 p.

112. Kennedy, P.J. Monoclonal antibodies: Technologies for early discovery and engineering / P.J. Kennedy, C. Oliveira, P.L. Granda, B. Samento // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2018. – 38. – P. 394–408.
113. Knappik, A. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides / A. Knappik, L. Ge, A. Honegger, *Journal of Molecular Biology*. – 2000. – 296(1). – P. 57–86.
114. Köhler, G. C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / G. Köhler, C. Milstein // *Nature*. – 1975. – 256. – P. 495–497.
115. Krumpe, L.R. T7 lytic phage-displayed peptide libraries exhibit less sequence bias than M13 filamentous phage-displayed peptide libraries / L.R. Krumpe, A.J. Atkinson, G.W. Smythers, A. Kandel, K.M. Schumacher, J.B. McMahon, L. Makowski, T. Mori. // *Proteomics*. – 2006. – 6. – P. 4210–4222.
116. Kyte, J. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein / J. Kyte, R.F. Doolittle // *Journal of Molecular Biology*. – 1982. – 157 (1). – P.105–32.
117. Kwong, P.D. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody / P.D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson // *Nature*. – 1998. – V. 93. – P. 648-659.
118. Lai, C.F. The purified 14-kilodalton envelope protein of vaccinia virus produced in *Escherichia coli* induces virus immunity in animals / C.F. Lai, S.C. Gong, M. Esteban // *J. Virol*. – 1991. – V. 65. – P. 5631–5635.
119. Larsen, J.E.P. Improved method for predicting linear B-cell epitopes / J.E.P. Larsen, O. Lund, M. Nielsen // *Immunome research*. – 2006. – 2. – P. 2.
120. Law, M., Antibody-sensitive and antibody-resistant cell-to-cell spread by vaccinia virus: role of the A33R protein in antibody-resistant spread / M. Law, R. Hollinshead, G. Smith // *J. Gen. Virol*. – 2002. – V. 83. – P. 209 – 222.
121. Lerner, R. Combinatorial antibody libraries: New advances, new immunological insights / R. Lerner // *Nature Reviews Immunology*. – 2016. – 16. – P.498–508.
122. Lin, C.L. Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in

- vitro and in vivo / C.L. Lin, C.S. Chung, H.G. Heine, W. Chang // *J. Virol.* – 2000. – V.74. – P. 3353-3365.
123. Maa, J.-S. Structural and functional studies of a 39000-Mr immunodominant protein of vaccinia virus / J.-S. Maa, M. Esteban // *J. Virol.* – 1987. – V. 61. – P. 3910 – 3919.
124. McCafferty, J. Phage antibodies: Filamentous phage displaying antibody variable domains / J. McCafferty, A.D. Griffiths, G. Winter, D.J. Chiswell // *Nature.* – 1990. – 348. – P. 552–554.
125. Maksyutov, R.A. Immunogenicity and protective efficacy of a polyvalent DNA vaccine against human orthopoxvirus infections based on smallpox virus genes / R.A. Maksyutov, E.V. Gavrilova, G.V. Kochneva, S.N. Shchelkunov // *Journal of Vaccines.* – 2013.
126. Mahy, B.W.J. Desk Encyclopedia of General Virology / B.W.J. Mahy, M.H.V. van Regenmortel. – Elsevier Science, USA, 2009. – P. 672.
127. Mallardo, M. Microtubule-dependent organization of vaccinia virus core-derived early mRNAs into distinct cytoplasmic structures / M. Mallardo, S. Schleich, L.J. Krijnse // *Molecular Biology of the Cell.* – 2001. – V. 12. – P. 3875–3891.
128. Marks, J.D. By-passing immunization: Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage / J.D. Marks, H.R. Hoogenboom, T.P. Bonnert, J. McCafferty, A.D. Griffiths, G. Winter // *Journal of Molecular Biology.* – 1991. – 222. – P. 581–597.
129. Martinez-Pomarez, L. The ps/hr gene (B5R open reading frame homolog) of rabbitpox virus control pock colour, is a component of extracellular enveloped virus, and is secreted into the medium / L. Martinez-Pomarez, R. Stern, R. Moyer // *J. Virol.* – 1993. – V.67. – P.5450-5462.
130. Matsumoto, Y. Screening of a library of T7 phage-displayed peptides identifies alphaC helix in 14-3-3 protein as a CBP501-binding site / Y. Matsumoto, Y. Shindo, Y. Takakusagi, K. Takakusagi, S. Tsukuda, T. Kusayanagi, H. Sato, T. Kawabe, F. Sugawara, K. Sakaguchi // *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* – 2011. – 19. – P. 7049–7056.
131. Mayrose, I. Pepitope: epitope mapping from affinity-selected peptides / I. Mayrose, O. Penn, E. Erez, N.D. Rubinstein, T. Shlomi, N.T. Freund, E.M. Bublil, E. Ruppin,

- R. Sharan, J.M. Gershoni, E. Martz, T. Pupko // *Bioinformatics*. – 2007. – 23. – P. 3244–3246.
132. McCausland, M.M. Combination therapy of vaccinia virus infection with human anti-H3 and anti-B5 monoclonal antibodies in a small animal model / M.M. McCausland, M.R. Benhnia, L. Crickard, J. Laudenslager, S.W. Granger, T. Tahara, R. Kubo, L. Koriazova, S. Kato, S. Crotty // *Antiviral therapy*. – 2010. – 15(4). – P. 661-675.
133. Meng, X. Generation and characterization of a large panel of murine monoclonal antibodies against vaccinia virus / X. Meng, Y. Zhong, A. Embry, B. Yan, S. Lu, G. Zhong, Y. Xiang // *Virology*. – 2011. – V. 409. – P. 271–279.
134. Moreau, V. Discontinuous epitope prediction based on mimotope analysis / V. Moreau, C. Granier, S. Villard, D. Laune, F. Molina // *Bioinformatics*. – 2006. – 22. – P. 1088–1095.
135. Morris, G.E. Epitope Mapping Protocols, In *Methods in Molecular Biology* / G.E. Morris. – Humana Press, USA, 1996. – V. 66. – P. 418.
136. Moss, B. Protein cleavage and poxvirus morphogenesis: tryptic peptide analysis of core precursors accumulated by blocking assembly with rifampicin / B. Moss, E. Rosenblum // *J. Mol. Biol.* – 1973. – V. 81. – P. 267-269.
137. Moss, B. Poxviridae, In *Fields virology*, Sixth Ed. (D.M. Knipe, P.M. Howley Eds.) / B. Moss. – Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2013. – pp. 2129–2159.
138. Nagler, F. Application of Hirst's phenomenon to the titration of vaccinia virus and vaccinia immune serum / F. Nagler // *Medical Journ. Austral.* – 1942. – V. 1. – P. 281-283.
139. Naik, A.S. Reverse epitope mapping of the E2 glycoprotein in antibody associated hepatitis C virus / A.S. Naik, A. Owsianka, B.A. Palmer, C.J. O'Halloran, N. Walsh, O. Crosbie, E. Kenny-Walsh, A.H. Patel, L.J. Fanning // *PLoS One*. – 2017. – 12(5).
140. Nixon, A.E. Drugs derived from phage display: From candidate identification to clinical practice / A.E. Nixon, D.J. Sexton, R.C. Ladner // *MAbs*. – 2014. – 6. – P. 73–85.
141. Nelson, G.E. Vaccinia virus entry/fusion complex subunit A28 is a target of neutralizing and protective antibodies / G.E. Nelson, J.R. Sisler, D. Chandran, B. Moss // *Virology*. – 2008. – V. 380(2). – P. 394-401.

142. Nemchinov, L.G. Development of a plant-derived subunit vaccine candidate against hepatitis C virus / L.G. Nemchinov, T.J. Liang, M.M. Rifaat // *Arch. Virol.* – 2000. – V. 145 – P. 2557-2573.
143. Oie, M. Characterization of vaccinia polypeptides / M. Oie, Y. Ichihashi // *Virology.* – 1981. – V. 113. – P. 263-276.
144. Ohashi, H. Efficiency of puromycin-based technologies mediated by release factors and a ribosome recycling factor / H. Ohashi, M. Ishizaka, N. Hirai, E.Miyamoto-Sato // *Protein Engineering, Design and Selection.* – 2013. – 26. – P. 533–537.
145. Ohlin, M. Characterization of human antibody repertoire following active immune responses in vivo. / M. Ohlin, C. A. Borrebaeck // *Molecular Immunology.* – 1996. – 33. – P. 583–592.
146. Parker, S. Therapeutic and prophylactic drugs to treat orthopoxvirus infections / S. Parker, L. Handley, R.M. Buller // *Future Virol.* – 2008. – V. 3. – P. 595–612.
147. Parren, P.W. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity / P.W. Parren, J.P. Moore, D.R. Burton // *Aids.* – 1999. – V. 13 – P. 137-162.
148. Payne, L.G. Characterization of Vaccinia virus glycoproteins by Monoclonal Antibody Precipitation / L.G. Payne // *Virology.* – 1992. – V. 197. – P. 251-260.
149. Payne, L.G. Polypeptide composition of extracellular enveloped vaccinia virus / L.G. Payne // *J. Virol.* – 1978. – V. 27. – P. 28 – 37.
150. Payne, L.G. Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia virus/ L.G. Payne // *J. Gen. Virol.* – 1980. – V. 50. – P. 89-100.
151. Pedersen, K. Characterization of Vaccinia virus intracellular cores: implications for viral uncoating and core structure / K. Pedersen, E. Snijder, S. Schleich, N. Roos, G. Griffiths, J. Krijnse Locker // *J. Virol.* – 2000. – V. 74. – P. 3525-3536.
152. Pütz, M.M. Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccinations / M.M. Pütz, C.M. Midley, M. Law, G.L. Smith // *Nature medicine.* – 2006. – V. 12 (11). – P. 1310-1315.

153. Qi, H. Phagemid vectors for phage display: Properties, characteristics and construction / H. Qi, H. Lu, H.J. Qiu, V. Petrenko, A. Liu // *Journal of Molecular Biology*. – 2012. – 417. – P. 129–143.
154. Rahumatullah, A. Delineation of BmSXP antibody V-gene usage from a lymphatic filariasis based immune scFv antibody library / A. Rahumatullah, A. Ahmad, R. Noordin, T.S. Lim // *Molecular Immunology*. – 2015. – 67. – P. 512–523.
155. Ravanello M.P. Characterization of the vaccinia virus L1R myristylprotein as a component of the intracellular virion envelope / M.P. Ravanello, D.E. Hruby // *J. Gen. Virol.* – 1994. – V. 75. – P. 1479-1483.
156. Reynolds M.G. Factors affecting the likelihood of monkeypox's emergence and spread in the post-smallpox era / M.G. Reynolds, D.S. Carroll, K.L. Karem // *Curr. Opin. Virol.* – 2012. – V. 2. – P. 335–343.
157. Rimoin, A.W. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo / A.W. Rimoin, P.M. Mulembakani, S.C. Johnston, J.O. Lloyd Smith, N.K. Kisalu, T.L. Kinkela, S. Blumberg, H.A. Thomassen, B.L. Pike, J.N. Fair, N.D. Wolfe, R.L. Shongo, B.S. Graham, P. Formenty, E. Okitolonda, L.E. Hensley, H. Meyer, L.L. Wright, J.J. Muyembe // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2010. – V.107. – P. 16262–16267.
158. Rodriguez, J. Characterization of early stages in vaccinia virus membrane biogenesis: implications of the 21-kilodalton protein and a newly identified 15-kilodalton envelope protein / J. Rodriguez, C. Risco, J. Carrascosa, M. Esteban, D. Rodriguez // *J. Virol.* – 1997. – V. 71. – P. 1821-1833.
159. Rodriguez, D. The vaccinia virus 14-kilodalton fusion protein forms a stable complex with the processed protein encoded by the vaccinia virus A17L gene / D. Rodriguez, J.R. Rodriguez, M. Esteban // *J. Virol.* – 1993. – V. 67. – P. 3435-3440.
160. Sakhatsky, P. Immunogenicity and protection efficacy of monovalent and polyvalent poxvirus vaccines that include the D8 antigen / P. Sakhatsky, S. Wang, T.H. Chou, S. Lu // *Virology*. – 2006. – V. 355(2). – P. 164-174.
161. Salzman, N.P. The rate of formation of vaccinia deoxyribonucleic acid and vaccinia virus / N.P. Salzman // *Virology*. – 1960. – V. 10. – P. 150–152.

162. Sarov I. Studies on the nature and location of capsid polypeptides of vaccinia virions / I. Sarov, W. Joklik // *Virology*. – 1972 – V. 50. – P. 579-592.
163. Satheshkumar, P.S. Characterization of a newly identified 35-amino-acid component of the vaccinia virus entry/fusion complex conserved in all chordopoxviruses / P.S. Satheshkumar, B.J. Moss // *Viol.* – 2009. – V. 83 (24). – P. 12822-12832.
164. Schmaljohn, C. Production and characterization of human monoclonal antibody Fab fragments to vaccinia virus from a phage-display combinatorial library / C. Schmaljohn, Y. Cui, S. Kerby, D. Pennock, K. Spik // *Virology*. – 1999. – 258. – P. 189–200.
165. Schreiber, A. 3D-Epitope-Explorer (3DEX): localization of conformational epitopes within three-dimensional structures of proteins / A. Schreiber, M. Humbert, A. Benz, U. Dietrich // *J. Comput. Chem.* – 2005. – 26. – P. 879–887.
166. Schutkowski, M. Epitope Mapping Protocols. 2th ed., In *Methods in Molecular Biology* / M. Schutkowski, U. Reineke. – Humana Press, USA, 2009. – V. 524. – P. 458.
167. Scott, A. Selection and characterization of single domain antibodies specific for *Bacillus anthracis* spore proteins / A. Scott, B. Walper, P.S. Lee, G.P. Anderson, E.R. Goldman // *Antibodies*. – 2013. – 2. – 152–167.
168. Scott, J.K. Random peptide libraries / J.K. Scott, L. Craig // *Curr. Opin. Biotech.* – 1994. – V. 5. – P. 40 – 48.
169. Scott, J.K. Search-ing for peptide ligands with an epitope library / J.K. Scott, G.P. Smith // *Science*. – 1990. – V. 249. – P. 386 – 390.
170. Seaman, M.S. Effect of vaccination with modified vaccinia Ankara (ACAM3000) on subsequent challenge with Dryvax / M.S. Seaman, M.B. Wilck, L.R. Baden, S.R. Walsh, L.E. Grandpre, C. Devoy, A. Giri, L.C. Noble, J.A. Kleinjan, K.E. Stevenson, H.T. Kim, R. Dolin // *J. Infect. Dis.* – 2010. – V. 201. – P. 1353–1360.
171. Seet, B.T. Poxviruses and immune evasion / B.T. Seet, J.B. Johnston, C.R. Brunetti, J.W. Barrett, H. Everett, C. Cameron, J. Sypula, S.H. Nazarian, A. Lucas, G. McFadden // *Annu Rev Immunol.* – 2003. – 21. – P. 377-423.
172. Sejvar J.J., Chowdary Y., Schomogyi M., Stevens J., Patel J., Karem K., Fischer M., Kuehnert M.J., Zaki S.R., Paddock C.D., Guarner J., Shieh W.J., Patton J.L., Bernard N., Li Y., Olson V.A., Kline R.L., Loparev V.N., Schmid D.S., Beard B., Regnery

- R.R. and Damon I.K. Human monkeypox infection: a family cluster in the midwestern United States // *J. Infect. Dis.* – 2004. – V. 190. – P. 1833–1840.
173. Senkevich, T.G. Poxvirus multiprotein entry-fusion complex / T.G. Senkevich, S. Ojeda, A. Townsley, G.E. Nelson, B. Moss // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – V. 102. – P. 18572-18577.
174. Shchelkunova, G.A. 40 Years without Smallpox / G.A. Shchelkunova, S.N. Shchelkunov // *Acta Naturae.* – 2017. – 9(4). – P. 4–12.
175. Singh, K. The Vaccinia Virus H3 Envelope Protein, a Major Target of Neutralizing Antibodies, Exhibits a Glycosyltransferase Fold and Binds UDP-Glucose / K. Singh, A.G. Gittis, R.K. Gitti, S.A. Ostazeski, H.P. Su, D.N. Garboczi // *J Virol.* – 2016. – 90(10). – P.5020–5030.
176. Smith, G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface / G. Smith // *Science.* – 1985. – V. 228. – P. 1315-1317.
177. Smith, G.L. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus / G.L. Smith, A. Vanderplasschen, M. Law // *Journal of General Virology.* – 2002. – V. 83. – P.2915–2931.
178. Smith, G.P. Phage display /, G.P. Smith, V.A. Petrenko // *Chemical Reviews.* – 1997. – 97. – P. 391–410.
179. Straus, S.K. Filamentous bacteriophage proteins and assembly /, S.K. Straus, H.E. Bo // *Subcellular Biochemistry.* – 2018. – 88. – P. 261–279.
180. Takahashi, T. N-terminal amino acid sequences of vaccinia virus structural proteins / T. Takahashi, M. Oie, Y. Ichihashi // *Virology.* – 1994. – V. 202. – P. 844-852.
181. Teesalu, T. Mapping of vascular ZIP codes by phage display / T. Teesalu, K.N. Sugahara, E. Ruoslahti // *Methods in Enzymology.* – 2012. – 503. – P. 35–56.
182. Tikunova, N.V. Phage antibodies from combinatorial library neutralize vaccinia virus / N.V. Tikunova, V.V. Morozova, T.A. Batanova, E.F. Belanov, N.I. Bormotov, A.A. Ilyichev // *Hum Antibodies.* – 2001. – 10(3-4). – P. 95-9.
183. Tikunova, N.V. Phage Display on the Base of Filamentous Bacteriophages: Application for Recombinant Antibodies Selection / N.V. Tikunova, V.V. Morozova // *Acta Naturae.* – 2009. – V 1(3). – P .6-15.

184. Tiller, T. A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties / Tiller T., Schuster I., Deppe D., K. Siegers, R. Strohner, T. Herrmann, M. Berenguer, D. Poujol, J. Stehle, Y. Stark, M. Heßling, D. Daubert, K. Felderer, S. Kaden, J. Kölln, M. Enzelberger, S. Urlinger // *MABs*. – 2013. – 5(3). – P. 445–470.
185. Tjandra, J.J. Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients / J.J. Tjandra, L. Ramadi, I.C. McKenzie // *Immunology and Cell Biology*. – 1990. – 68. – 367–375.
186. Tonegawa, S. Somatic generation of antibody diversity / S. Tonegawa // *Nature*. – 1983. – 302. – P. 575–581.
187. Tsunetsugu-Yokota, Y. Expression of an immunogenic region of HIV by a filamentous bacteriophage vector / Y. Tsunetsugu-Yokota, M. Tatsumi, V. Robert, C. Devaux, B. Sprite, J.-C. Chermann, I. Hirsch // *Gene*. – 1991. – V. 99. – P. 323–326.
188. Unkauf, T. Generation of recombinant antibodies against toxins and viruses by phage display for diagnostics and therapy / T. Unkauf, S. Miethe, V. Fühner, T. Schirrmann, A. Frenzel, M. Hust // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2016. – 917. – P. 55–76.
189. Van Regenmortel, M.H.V. Structural and functional approaches to the study of protein antigenicity / M.H.V. Van Regenmortel // *Immunol. Today*. – 1989. – V. 1. – P. 266–272.
190. Van Regenmortel, M.H.V. Epitope Mapping Protocols. 2th ed., In *Methods in Molecular Biology* / M.H.V. Van Regenmortel. – Humana Press, USA, 2009. – V. 524. – P. 3.
191. Vázquez, M.I. Identification of functional domains in the 14-kilodalton envelope protein (A27L) of vaccinia virus / M.I. Vázquez, M. Esteban // *J. Virol*. – 1999. – V. 73 (11). – P. 9098–9109.
192. Von Krempelhuber, A. A randomized, double-blind, dose-finding Phase II study to evaluate immunogenicity and safety of the third generation smallpox vaccine candidate IMVAMUNE / A. Von Krempelhuber, J. Vollmar, R. Pokorny, P. Rapp, N. Wulff, B. Petzold, A. Handley, L. Mateo, H. Siersbol, H. Kollaritsch, P. Chaplin // *Vaccine*. – 2010. – V. 28. – P. 1209–1216.

193. Wallengren, K. The A17L gene product of Vaccinia virus is exposed on the surface of IMV / K. Wallengren, C. Risco, J. Krijnse Locker, M. Esteban, D. Rodriguez // *Virology*. – 2001. – V. 290. – P. 143-152.
194. Wang, L.-F. Use of a gene-targeted phage display random epitope library to map an antigenic determinant on the blue-tongue virus outer capsid protein VP5 / L.-F. Wang, D.H. Du Plessis, J.R. White, A.D. Hyatt, B.T Eaton // *J. Immunol. Methods*. – 1995. – V. 178. – P. 1-12.
195. Wang L.-F. Epitope identification and discovery using phage-display libraries: applications in vaccine development and diagnostics / L.-F. Wang, M. Yu // *Curr. Drug Targets*. – 2004. – V. 5. – P. 1 – 15.
196. Westwood, O.M.R. *Epitope Mapping: A Practical Approach*. Oxford / O.M.R. Westwood, F.C. Hay. – University Press, Oxford, UK, 2001. – P. 284.
197. Weitkamp, J.H. Infant and adult human B cell responses to rotavirus. Share common immunodominant variable gene repertoires / J.H. Weitkamp, N. Kallewaard, K. Kusuhara, E. Bures, J.V. Williams, B. LaFleur, H.B. Greenberg, J.E. Crowe Jr. // *J. Immunol.* – 2003. – 171. – P. 4680–4688.
198. Wilcock, D. Vaccinia virions lacking core protein VP8 are deficient in early transcription / D. Wilcock, G.L. Smith // *J. Virol.* – 1996. – V. 70. – P. 934-943.
199. Wilcock, D. Vaccinia virus core protein VP8 is required for virus infectivity, but not for core protein processing or for INV and EEV formation / D. Wilcock, G.L. Smith // *Virology*. – 1994. – V. 202. – P. 294-304.
200. Wilson, C.J. Yeast artificial chromosome targeting technology: an approach for the deletion of genes in the C57BL/6 mouse / C.J. Wilson, C. Guglielmo, N.D. Moua, M. Tudor, G. Grosveld, R.A. Young, P.J. Murray // *Anal. Biochem.* – 2001. – 296(2). – P. 270-278.
201. Wilton, S. Identification of antigenic determinants by polyclonal and hybridoma antibodies during the course of infection by vaccinia virus / S. Wilton, J. Gordon, S. Dales // *Virology*. – 1986. – 148. – P. 84-96.
202. Winter, G. Making antibodies by phage display technology / G. Winter, A.D. Griffiths, R.E. Hawkins, H.R. Hoogenboom // *Annual Review of Immunology*. – 1994. – 12. – P. 433–455.

203. Wollfe, E. The vaccinia virus A33R protein provides a chaperone function for viral membrane localization and tyrosine phosphorylation of the A36R protein / E. Wollfe, A. Weisberg, B. Moss // *J. Virol.* – 2001. – V. 75. – P. 303-310.
204. Wu, H. Stepwise in vitro affinity maturation of vitaxin, an alpha v beta 3-specific humanized mAb / H. Wu, G. Beuerlein, Y. Nie, H. Smith, B.A. Lee, M. Hensler, W.D. Huse, J.D. Watkins // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* – 1998. – 95. – P. 6037–6042.
205. Wyatt, R. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein / R., Wyatt, P.D., Kwong, E., Desjardins // *Nature.* – 1998a. – V. 393 – P. 705-711.
206. Wyatt R. The HIV-1 envelope glycoproteins: Fusogens, antigens and immunogens / R. Wyatt and J. Sodroski // *Science.* – 1998b. – V. 280. – P. 1884–1888.
207. Yan, X. Ribosome-display technology: Applications for directed evolution of functional proteins / X. Yan, Z Xu. // *Drug Discovery Today.* – 2006. – 11. – P. 911–916.
208. Yang, G. An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus challenge / G. Yang, D.C. Pevear, M.H. Davies, M.S. Collett, T. Bailey, S. Rippen, L. Barone, C. Burns, G. Rhodes, S. Tohan, J.W. Huggins, R.O. Baker, R.L. Buller, E. Touchette, K. Waller, J. Schriewer, J. Neyts, E. DeClercq, K. Jones, D. Hruby R. Jordan // *J. Virol.* – 2005. – V. 79. – P. 13139–13149.
209. Zhang, Y. Vaccinia virus morphogenesis is interrupted when expression of the gene encoding an 11-kilodalton phosphorylated protein is prevented by the *Escherichia coli* lac repressor / Y. Zhang, B. Moss // *J. Virol.* . – 1991. – 65. – P. 6101-6110.
210. Zinoviev, V.V. Identification of the gene encoding vaccinia virus immunodominant protein p35 / V.V. Zinoviev, N.A. Tchikaev, O.Yu. Chertov, E.G. Malygin // *Gene.* – 1994. – V.147. – P. 209-214.