

На правах рукописи

МАТВЕЕВ АНДРЕЙ ЛЕОНИДОВИЧ

**ПРОТЕКТИВНОЕ ХИМЕРНОЕ АНТИТЕЛО
ПРОТИВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА:
ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

Тикунова Нина Викторовна д.б.н.

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

Официальные оппоненты:

Локтев Валерий Борисович, д.б.н., проф.

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

Нетесов Сергей Викторович, чл.корр РАН, д.б.н.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

Рыкова Елена Юрьевна, д.б.н.

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

Защита состоится «25» декабря 2019 г. в 12:00 часов
на заседании диссертационного совета ИХБФМ 03.01 при
Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
по адресу: 630090, Новосибирск-90, пр. Лаврентьева, 8

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

Автореферат разослан «22» ноября 2019 г.

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



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Клещевой вирусный энцефалит (КЭ) – природно-очаговое инфекционное заболевание, способное привести к тяжелым неврологическим последствиям и даже смерти больного. Этиологическим агентом является вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), представитель семейства *Flaviviridae*. ВКЭ в основном передается при укусах иксодовых клещей, населяющих лесные районы Евразии. Кроме РФ, заболевания, вызванные ВКЭ, регистрируются в Китае, Монголии, Казахстане и в 27 европейских странах.

Существует три основных субтипа ВКЭ – Дальневосточный, Европейский и Сибирский, причем считается, что ВКЭ Европейского субтипа чаще всего вызывает легкие формы КЭ, наиболее тяжелые формы чаще ассоциируются с ВКЭ Дальневосточного субтипа, а ВКЭ Сибирского субтипа вызывает КЭ с промежуточной тяжестью [Gritsun et al., 2003a; 2003b]. В некоторых регионах Евразии встречаются два или даже три основных субтипа ВКЭ; к таким регионам относятся Сибирь.

Наиболее эффективным способом борьбы с КЭ является вакцинопрофилактика. В настоящее время эффективные вакцины производятся и в РФ, и за рубежом. Однако, в ряде регионов уровень вакцинации недостаточен. В большинстве стран, где встречается ВКЭ, отсутствуют специфические препараты для лечения КЭ. Производство выпускавшегося ранее анти-ВКЭ сывороточного иммуноглобулина FSME-Bulin было приостановлено из-за опасений относительно возможного антители-зависимого усиления инфекции после его введения пациентам. В РФ, где регистрируется большинство наиболее тяжелых и смертельных случаев КЭ, для его экстренной профилактики и терапии применяют иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита, получаемый из донорской крови. Этот препарат обладает выраженным терапевтическим действием, а также защитным эффектом, при введении не вакцинированным людям в первые дни после укуса зараженного клеща [Лашкевич и Карганова, 2007; Пеньевская и Рудаков, 2010]. Однако, как и другие препараты, получаемые из донорской крови, противоклещевой иммуноглобулин обладает некоторыми недостатками, включая ограниченное количество плазмы от вакцинированных доноров; гетерогенность используемой донорской крови и, как следствие, недостаточная стандартизация препарата; потенциальный биологический риск, связанный с присутствием в донорской крови не идентифицированных инфекционных агентов, прионов и аллергенов. В связи с этим необходима разработка альтернативных противоклещевых препаратов, в производстве которых не используется донорская кровь.

Перспективным подходом к разработке нового препарата является создание специфических рекомбинантных антител, в частности, химерного антитела против ВКЭ. В химерных антителах к константным доменам иммуноглобулинов человека присоединены вариабельные домены моноклональных антител мыши. Ранее в НИБХ СО АН (ныне ИХБФМ СО РАН) была получена большая панель моноклональных антител мыши против гликопротеина Е ВКЭ. Некоторые из этих антител обладали способностью нейтрализовать инфекционность ВКЭ *in vitro* [Tsekhanovskaya et al., 1993]. На основе вариабельных доменов вируснейтрализующих мышиных антител

было создано несколько химерных антител против ВКЭ, два из них были способны нейтрализовать инфекционность ВКЭ *in vitro* [Baykov et al., 2014; Levanov et al., 2010]. Одно химерное антитело защищало мышей, инфицированных ВКЭ Европейского субтипа, однако оно нарабатывалось в транзистентной системе экспрессии [Baykov et al., 2014].

Целью данной работы являлось создание штамма-продуцента химерного антитела, обладающего протективной активностью в отношении трех основных субтипов ВКЭ.

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

1. Создать штамм эукариотических клеток, стабильно продуцирующих химерное антитело против ВКЭ.
2. Получить препарат очищенного химерного антитела и оценить аффинность этого антитела.
3. Определить эпитопную специфичность химерного антитела против ВКЭ.
4. Исследовать протективные свойства химерного антитела против ВКЭ в отношении Дальневосточного, Сибирского и Европейского субтипов вируса в экспериментах *in vivo*.
5. Изучить возможность усиления инфекции при введении суб-протективных доз антитела.

Научная новизна и практическая значимость работы. В данной работе впервые был создан стабильный штамм суспензионных клеток, продуцирующих химерное антитело против белка Е ВКЭ и показано, что химерное антитело chFVN145 способно защищать модельных животных от заражения штаммами ВКЭ трех основных субтипов – Европейского, Сибирского и Дальневосточного. Введение антитела chFVN145 через 1, 2 и 3 дня после заражения спасало более 50% модельных животных; введение суб-протективных доз этого широко-протективного химерного антитела зараженным животным не вызывало усиления инфекции. Впервые локализован на петлях в N-концевом участке домена D3 белка Е ВКЭ эпитоп, отвечающий за связывание с широко-протективным антителом chFVN145.

Практическая значимость работы состоит в разработке потенциально терапевтического препарата для экстренной профилактики и терапии КЭ. Кроме того, создана панель штаммов на основе суспензионных эукариотических клеток для разработки на их основе штаммов-продуцентов эукариотических белков; сконструированы кассетные векторные плазмиды для создания с их помощью штаммов-продуцентов различных полноразмерных антител. Выявленная последовательность эпитопа, узнаваемого широко-протективным антителом chFVN145, может быть полезна при создании полиэпитопных вакцин и исследовании механизмов антитело-зависимого усиления инфекции и нейтрализации ВКЭ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Созданный оригинальный суспензионный штамм CHO-S/FRT, в геноме которого сайты гомологичной рекомбинации введены в транскрипционно активные участки хроматина, пригоден для создания на его основе штаммов-продуцентов полноразмерных антител.
2. Химерное антитело chFVN145 обладает наномолярной аффинностью.
3. Обнаружен новый эпитоп в составе белка Е ВКЭ, включающий

аминокислотные остатки 307-313 и 333–338, расположенные в домене D3.

4. Химерное антитело chFVN145 способно защищать мышей от заражения ВКЭ Дальневосточного, Сибирского и Европейского субтипов.

5. Введение суб-протективных доз антитела chFVN145 не вызывало у зараженных мышей уменьшения средней продолжительности жизни по сравнению с контрольными зараженными мышами, которым не вводили антитело.

Апробация работы и публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Материалы диссертации были представлены на 9 Российских конференциях и 7 международных конференциях, из них 2: 38-th FEBS Congress (Санкт-Петербург, Россия, 2013); 43rd FEBS Congress (Прага, Чешская Республика, 2018), материалы которых индексируются в Web of Science и Scopus.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов, их обсуждения, заключения и списка литературы. Работа изложена на 150 страницах, содержит 20 рисунков и 4 таблицы. Библиография включает 314 литературных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Создание штамма-продуцента химерного антитела против вируса клещевого энцефалита на основе эукариотических клеток

Создание суспензионной линии СНО-S

При создании промышленных клеточных линий чаще всего используют суспензионный тип культивирования штаммов-продуцентов в бессывороточных синтетических средах, поскольку такой тип культивирования обладает рядом преимуществ: способность клеточной культуры достигать высокой плотности; отсутствие контаминации в стандартизованных синтетических средах; возможность культивирования в любом типе промышленных биореакторов.

Для перевода клеток СНО-K1 на суспензионный тип культивирования на первом этапе их адаптировали к росту в синтетической среде. Для этого вначале их культивировали в среде, содержащей эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС), постепенно уменьшая содержание ЭТС с 10% до 0%. При полном исключении сыворотки клетки СНО-K1 высевали в синтетическую среду ProСНО-АТ и пассировали, пока клетки не восстановили скорость пролиферации. После адаптации к росту в бессывороточной среде ProСНО-АТ полученные клетки адаптировали к суспензионному росту в среде ProСНО-4, содержащей не ионный сурфактант pluronic F-68. Для этого их высевали в мини-биореакторы объемом 50 мл, инкубировали на шейкере для CO₂-инкубатора при 150 об/мин, пока не восстановилась их скорость деления. В результате были получены клетки СНО-S, адаптированные к суспензионному росту в бессывороточных средах.

Получение штамма-продуцента химерного антитела против ВКЭ с использованием плазмид pCLm4/hygro-FVN145 и pCHm2 -FVN145

Для получения плазмид, кодирующих тяжелые и легкие цепи химерного антитела chFVN145 использовали ранее сконструированные каскадные плазмиды pCHm2 и pCLm4/hygro, кодирующие константные домены тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов человека, и содержащие гены устойчивости к генетицину G418 (pCHm2) и к гиромоцину Б (pCLm4/hygro) [Байков и др., 2012]. Из гибридных клеток FVN-145 (предоставлены Матвеевым Л.Э., ИХБФМ СО РАН) выделяли суммарную РНК, а затем с помощью ОТ-ПЦР и праймеров VH_dir и VH_rev, а также праймеров VL_dir и VL_rev получали ПЦР-продукты, кодирующие соответственно переменные домены тяжелой и легкой цепей моноклонального антитела (мкАТ) FVN-145. Полученные ПЦР-продукты и плазмиды pCHm2 и pCLm4/hygro были обработаны соответствующими эндонуклеазами рестрикции и объединены в реакции лигирования. Правильность встройки ДНК-фрагментов подтверждали секвенированием.

Сконструированные плазмиды pCHm2-FVN145 и pCLm4/hygro-FVN145 (рис. 1) нарабатывали в клетках *E. coli* XL1blue и очищали из лизатов с использованием набора “PureYield plasmid midiprep system”. Для получения химерного антитела производили одновременную трансфекцию клеток CHO-S смесью, содержащей эквивалентные количества обеих плазмид. Трансфекцию проводили с помощью Lipofectamin 2000 согласно инструкции производителя. Культуральную жидкость, содержащую химерное антитело, отбирали через 48 часов после трансфекции и методом ИФА определяли в ней наличие антитела. После подтверждения экспрессии трансфицированными клетками целевого антитела их пересевали в селек-

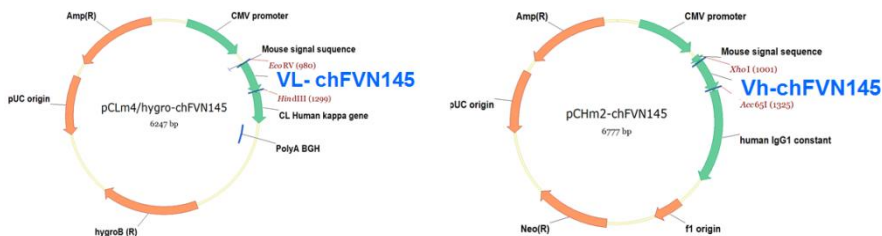


Рис. 1 – Карты плазмид pCHm2-FVN145 и pCLm4/hygro-FVN145.

тивную среду CD OptiCHO, содержащую 200 мкг/мл гиромоцина Б и 400 мкг/мл генетицина G418. Селективную среду заменяли каждые 3-4 дня. После достижения клетками 90% жизнеспособности из полученной поликлональной популяции отбирали отдельные клоны методом предельных разведений.

Всего было проанализировано более 700 отдельных клонов, и было показано, что максимальная продуктивность полученных таким способом клонов не превышала 5 мг/л. Кроме того, продуктивность всех отобранных клонов не была стабильной и снизилась на 50% через 30 пассажей.

Достигнутый низкий уровень продукции можно объяснить тем, что при использованной схеме клонирования интеграция в геном проходила случайным образом, и вероятность встройки одной из плазмид в неактивный участок хроматина была высока. В связи с этим было принято решение

получить штамм-продуцент с использованием бицистронной плазмиды, которая одновременно содержала гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи химерного антитела против ВКЭ.

Получение штаммов-продуцентов химерного антитела против ВКЭ с использованием бицистронной плазмиды pBudCE4.1 и ее производных

В работе использовали коммерческую бицистронную плазмиду pBudCE4.1, которая содержит два эукариотических промотора – для одновременной и независимой экспрессии двух разных целевых белков или двух субъединиц одного белка. Кроме того, эта плазида содержит ген устойчивости к зеоцину, который можно использовать в качестве селективного маркера (рис. 2).

Получение клонов, продуцирующих химерное антитело против ВКЭ с использованием бицистронной плазмиды pBudCE4.1

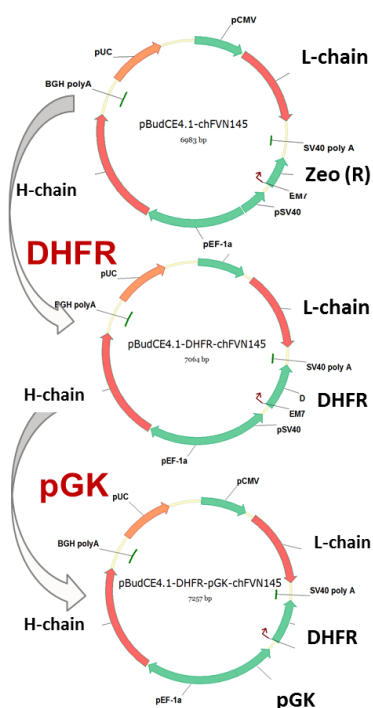


Рис. 2 – Схема конструирования плазмид pBudCE4.1-DHFR и pBudCE4.1-DHFR-pGK.

клонов была не более 10 мг/л. Кроме того отобранные клоны так же были нестабильны, их продуктивность снижалась на 50-60% через 30 пассажей

ПЦР-фрагменты, кодирующие тяжелую и легкую цепи химерного антитела chFVN145, получали в ПЦР с использованием в качестве матриц соответственно плазмиды pChm2-FVN145 и pCLm4/hygro-FVN145 и соответствующие праймеры, содержащие сайты для клонирования. Сначала в плазмиду pBudCE4.1 был встроен ген, кодирующий легкую цепь антитела; затем в полученную промежуточную плазмиду встроили ген, кодирующий тяжелую цепь антитела. Правильность последовательных этапов клонирования подтверждали секвенированием.

Для получения штамма-продуцента антитела chFVN145 проводили трансфекцию клеток CHO-S с помощью Lipofectamin 2000. Через 48 часов после трансфекции клетки, пересевали в селективную среду CD OptiCHO, содержащую 200 мкг/мл зеоцина, замену селективной среды на свежую проводили каждые 3-4 дня. После достижения клетками 90% жизнеспособности из полученной поликлональной популяции получали отдельные клоны.

Всего было проанализировано около 1000 отдельных клонов, максимальная продуктивность у проанализированных

Конструирование плазмиды pBudCE4.1-DHFR и получение клонов, продуцирующих химерное антитело против ВКЭ

Амплификация целевых генов в геноме клеток-продуцентов может существенно повысить продуктивность штамма. Такую амплификацию можно проводить с использованием дигидрофолатредуктазы (DHFR), которую также можно использовать как селективный маркер. В связи с этим, в плазмиде pBudCE4.1-chFVN145 заменили ген устойчивости к зеоцину на ген *dhfr*. Для этого на первом этапе получили ПЦР-продукт, содержащий ген *dhfr*, с использованием праймеров DHFR_MscII_U и DHFR_PstI_L и ДНК плазмиду pSEL1 [Massey-Gendel et al, 2009] в качестве матрицы. Затем полученный ПЦР-продукт и плазмиду pBudCE4.1 обрабатывали рестриктазами MscII и PstI и объединяли в реакции лигирования (рис. 2). После лигирования корректность клонирования проверяли секвенированием. Затем в плазмиду pBudCE4.1-DHFR были встроены гены, кодирующие тяжелую и легкую цепь химерного антитела chFVN145, как описано выше, и в результате была получена плазида pBudCE4.1-DHFR-chFVN145.

Трансфекцию клеток CHO-S плазмидой pBudCE4.1-DHFR-chFVN145 проводили с помощью Lipofectamin 2000. Через 48 часов после трансфекции полученные клетки пересевали в селективную среду CD OptiCHO, содержащую 400 нМ метотрексата. Селективную среду меняли каждые 3-4 дня. При достижении клетками 90% жизнеспособности, из полученной поликлональной популяции получали отдельные клоны.

Около 500 отдельных клонов было проанализировано, максимальная продуктивность полученных клонов достигала 20 мг/л. Затем для повышения продуктивности была проведена амплификация целевых генов. Для этого в селективной среде была увеличена концентрация метотрексата до 1,2 мкМ. После амплификации и клонирования максимальная продуктивность у новых клонов составляла 40 мг/л. Однако, отобранные клоны так же были нестабильны, их продуктивность снижалась на 40-70% через 30 пассажей.

Конструирование плазмиды pBudCE4.1-DHFR-pGK и получение клонов, продуцирующих химерное антитело против ВКЭ

Еще одним возможным способом повышения продуктивности могло быть снижение транскрипционной активности гена *dhfr* с тем, чтобы при добавлении метотрексата в культуральную среду выжили только те клоны, в которых амплификация в геноме целевой плазмиды прошла наиболее эффективно. В связи с этим, в плазмиде pBudCE4.1-DHFR в генной кассете, содержащей ген *dhfr*, был заменен эффективный эукариотический промотор pSV40 на слабый промотор гена фосфолипидкиназы 1 мышцы pGK (рис. 2).

Для создания этого варианта плазмиды на первом этапе получили ПЦР-продукт, содержащий промотор pGK, с использованием праймеров pGK_NheI_U и pGK_AvrII_L и плазмиды pExT [Tasic et al., 2012] в качестве матрицы. На втором этапе полученный ПЦР-продукт и плазмиду pBudCE4.1-DHFR обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NheI* и *AvrII* (рис. 2) и объединяли в реакции лигирования. Корректность конструирования промежуточной плазмиды pBudCE4.1-DHFR-pGK проверяли секвенированием. Затем в эту плазмиду встраивали гены, кодирующие

тяжелую и легкую цепи антитела chFVN145, и в результате была получена плаزمида pBudCE4.1-DHFR-pGK-chFVN145.

Клетки CHO-S трансфицировали плазмидой pBudCE4.1-DHFR-pGK-chFVN145 с использованием Lipofectamin 2000. Трансфицированные клетки через 48 часов после трансфекции пересевали в селективную среду CD OptiCHO, содержащую 400 нМ метотрексата. После достижения клетками 90% жизнеспособности, из полученной поликлональной популяции получали отдельные клоны, как описано выше.

Было проанализировано около 500 отдельных клонов; максимальная продуктивность у некоторых достигала 20 мг/л. Для повышения продуктивности проводили амплификацию генов в 10 отобранных линиях с максимальной продуктивностью. После амплификации и клонирования максимальная продуктивность у ряда новых клонов достигла 100 мг/л. Однако, проверка стабильности продуктивности отобранных линий показала, что через 30 пассажей продуктивность снижалась на 50-80%.

Чаще всего на уровень экспрессии трансгенов влияет их локализация в геноме. Все предыдущие схемы клонирования предполагали случайную вставку целевых генов в геном. Для повышения стабильности продукции необходимо использовать сайт-специфическую интеграцию в геном. Для создания такой системы необходимо было сконструировать штамм клеток-хозяев, несущих в транскрипционно активном локусе генома сайт для направленной интеграции целевой ДНК, и сконструировать векторные плазмиды, содержащие участки ДНК, обеспечивающие интеграцию в геном клетки-хозяина.

Создание суспензионной линии CHO-S/FRT

Для оптимизации последующего процесса отбора клонов в коммерческой плазмиде pFRT/LacZeo заменили ген, кодирующий слитый белок *LacZeo* на ген слитого белка GFPZeo (*gfp*, соединенный с белком, обеспечивающим устойчивость к зеоцину). Для этого был получен ПЦР продукт с использованием праймеров GFP-Zeo-*HindIII* и GFP-Zeo-*BssHII*_L, содержащий ген GFP. Далее плазмидную ДНК pFRT/LacZeo и полученный ПЦР-фрагмент, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *HindIII* и *BssHII* и объединяли в реакции лигирования. В результате была получена плаزمида pFRT/GFPZeo.

Затем клетки линии CHO-S трансфицировали плазмидой pFRT/GFPZeo с использованием Lipofectamine 2000. Через 24 часа после трансфекции оценивали количество трансфектантов с помощью проточной цитофлуориметрии. Было показано, что не менее 50% клеток экспрессировали белок GFP (рис. 3а). Через 48 часов после трансфекции полученный пул клеток высевали в селективную среду CD OptiCHO, содержащую 200 мкг/мл зеоцина. Селективную среду полностью заменяли каждые 3-4 дня. Затем были получены отдельные клоны.

Полученные клоны анализировали по уровню экспрессии GFP методом проточной цитофлуориметрии. Клоны с наибольшим уровнем продукции GFP проверяли на стабильность. Через 30-35 пассажей культивирования в ростовой среде без селективного антибиотика, определяли уровень продукции

GFP в этих клонах. В результате был отобран клон, названный CHO-S/FRT (рис. 3б).

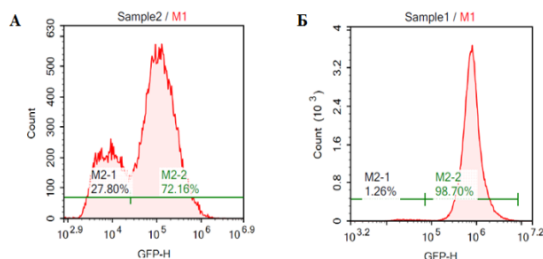


Рис. 3 – Анализ изменения флуоресценции трансфицированных клеток CHO-S по уровню GFP с помощью проточной цитофлуориметрии: а – пул трансфицированных клеток CHO-S через 24 после трансфекции; б – пул полученных клеток CHO-S/FRT, после селекции

Конструирование кассетной плазмиды, кодирующей константные домены антитела человека, сайт гомологичной рекомбинации FRT и участки для быстрого клонирования генов, кодирующих целевые переменные домены антител

Использование бицистронной плазмиды для создания штамма-продуцента рекомбинантного антитела показало хорошие результаты по продуктивности, но полученные штаммы не были стабильны. Для увеличения стабильности продукции в дальнейших исследованиях сконструировали бицистронную плазмиду, содержащую сайт гомологичной рекомбинации и гены, кодирующие константные домены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина человека. Схема клонирования представлена на рисунке 4А.

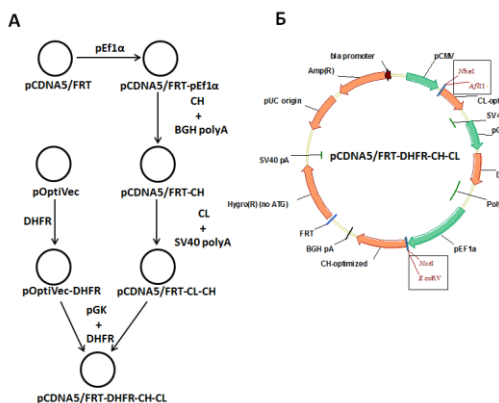


Рис. 4 – Схема конструирования кассетной векторной плазмиды pCDNA5/FRT-DHFR-CH-CL (А) и генетическая схема организации плазмиды pCDNA5/FRT-DHFR-CH-CL (Б).

Сначала в коммерческую плазмиду pCDNA5/FRT, содержащую FRT-сайт для гомологичной рекомбинации, клонировали промотор pEf-1α. ПЦР-фрагмент, содержащий промотор pEf1α получали с использованием праймеров Ef1α_U17 и Ef1α_L22 и плазмиды pBudCE4.1 (Life Technologies) в качестве матрицы. Затем полученный фрагмент и плазмиду pCDNA5/FRT обрабатывали рестриктазами KpnI и BamHI. Полученные фрагменты объединяли в реакции лигирования. Таким образом была получена промежуточная плаزمиды pCDNA5/FRT-pEf1α

На втором этапе в плазмиду pCDNA5/FRT-pEfl α встраивали ген, кодирующий константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина человека и сайт полиаденилирования BGH. Для этого с помощью праймеров CH_U22 и BGH_polyA_L18 получали ПЦР-фрагмент, в качестве матрицы использовали созданную нами ранее плазмиду pBudCE4.1/full_Ab. Далее полученный ПЦР-фрагмент и плазмидную ДНК pCDNA5/FRT-pEfl α обрабатывали эндонуклеазой *XhoI*. Полученные фрагменты объединяли в реакции лигирования. В результате была получена плаزمида pCDNA5/FRT-CH.

На третьем этапе в плазмиду pCDNA5/FRT-CH встраивали ген, кодирующий константный домен легкой цепи с сайтом полиаденилирования вируса SV40. Для этого с использованием праймеров CL_U21 и SV40_polyA_L30 получали ПЦР-фрагмент с этим геном. В качестве матрицы использовали плазмиду pBudCE4.1/full_Ab. Затем плазмидную ДНК pCDNA5/FRT-CH и полученный ПЦР-фрагмент обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *HindIII*. Полученные очищенные фрагменты объединяли в реакции лигирования.

В ходе четвертого этапа получали промежуточную плазмиду, в которой ген *dhfr* контролировался слабым эукариотическим промотором. Для этого в плазмиде pOptiVec-TOPO, содержащей ген *dhfr*, заменили IRES-элемент вируса энцефаломиокардита на слабый эукариотический промотор pGK. С использованием праймеров pGK_U20 и pGK_L17 был получен ПЦР-фрагмент, содержащий pGK, в качестве матрицы использовали плазмиду pExT [Tasic et al., 2012]. Плазмидную ДНК pOptiVec-TOPO и полученный ПЦР-фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *HpaI* и *BglIII* и объединяли в реакции лигирования. В результате была получена плазмида pOptiVec-DHFR.

На последнем этапе в плазмиду pCDNA5/FRT-CH-CL встраивали ген *dhfr* под контролем промотора pGK. Для этого получали ПЦР-фрагмент, содержащий промотор pGK, ген *dhfr* и сайт полиаденилирования тимидинкиназы с использованием праймеров pGK_APA_U20 и DHFR_L21. В качестве матрицы для получения этого ПЦР-продукта использовали плазмиду pOptiVec-DHFR. Плазмидную ДНК pCDNA5/FRT-CH-CL и полученный ПЦР-фрагмент обрабатывали эндонуклеазами *ApaI* и *Ksp22I* и объединяли в реакции лигирования. Полученная в результате кассетная плазмида pCDNA5/FRT-DHFR-CL-CH, содержащая ген *dhfr*, организована таким образом, что перед генами, кодирующими константные домены тяжелой и легкой цепей антитела человека, находились уникальные сайты узнавания эндонуклеаз. Кроме того, у гена, кодирующего гигромицин Б фосфотрансферазу отсутствовал стартовый кодон ATG, а FRT-сайт был расположен на 5'-конце этого гена.

Конструирование плазмиды с генами, кодирующими химерное антитело chFVN145, и локусами, обеспечивающими сайт-направленную рекомбинацию в геноме

Для получения целевой плазмиды были наработаны ПЦР-продукты, кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела chFVN145. В качестве матрицы для ПЦР использовали плазмиду pCHm2-FVN145 и плазмиду pCLm4/hygro-FVN145. ПЦР-продукт, содержащий ген тяжелой цепи был получен с

помощью праймеров VH_dir_NotI и VH_rev_EcoRV. ПЦР-продукт, содержащий ген легкой цепи был получен с использованием праймеров VL_dir_NheI и VL_rev_AflII.

Сконструированную касетную плазмиду pCDNA5/FRT-DHFR-CH-CL и ПЦР-продукт, содержащий ген тяжелой цепи антитела chFVN145, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NotI и EcoRV и объединяли в реакции лигирования. Затем полученную промежуточную плазмиду и фрагмент, кодирующий вариабельный домен гена легкой цепи антитела chFVN145, гидролизovali рестриктазами NheI и AflII, и после объединения в реакции лигирования. В результате была сконструирована плаزمида pCDNA5/FRT-DHFR-chFVN145.

Создание штамма-продуцента химерного антитела chFVN145 с использованием гомологичной рекомбинации

Для получения линии клеток, продуцирующих химерное антитело человека против гликопротеина Е ВКЭ, суспензионные линии сконструированных нами клеток CHO-S/FRT были трансфицированы с помощью Lipofectamine 2000 двумя плазмидами: вспомогательной плазмидой pOG44 с геном, кодирующим флиппазу, и плазмидой pCDNA5/FRT-DHFR-full_FVN145 с геном *dhfr* и геном, кодирующим антитело chFVN145. Плазмиды вводили в соотношениях 19/1, 14/1, 9/1 и 4/1 по молекулярным массам плазмид, соответственно.

Эффективность трансфекции оценивали методом проточной цитофлуориметрии, определяя процент трансфицированных клеток, не содержащих GFP. Количество неокрашенных GFP клеток колебалось от 19 до 46% при разных условиях трансфекции (рис. 5). Лучшая эффективность наблюдалась при ко-трансфекции плазмидами pCDNA5/FRT-DHFR-full_FVN145 и pOG44 в соотношении 9/1 по их молекулярным массам.

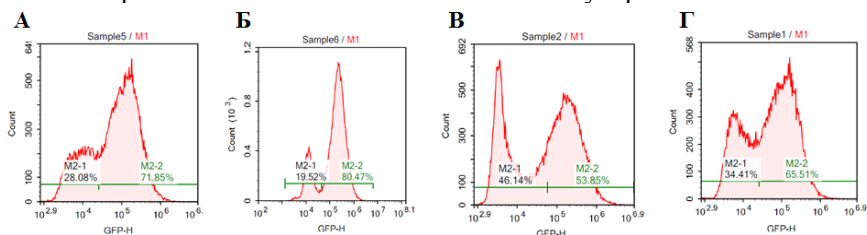


Рис. 5 – Анализ изменения флуоресценции клеток CHO-S/FRT по уровню GFP, выполненный методом проточной цитофлуориметрии, клетки были трансфицированы плазмидами pOG44 и pCDNA5/FRT-DHFR-full_FVN145 в разных соотношениях по массам плазмид: А – 19/1; Б – 14/1; В – 9/1; Г – 4/1

Поскольку интеграция в геном плазмиды, содержащей FRT сайт, активировала ген устойчивости к гигромицину и инактивировала слитый белок GFP-Zeo, стабильные клеточные линии, в которых произошла гомологичная рекомбинация по FRT-сайту, отбирались по устойчивости к гигромицину и чувствительности к зеоцину, а также по отсутствию экспрессии белка GFP. Пулы с наименьшей долей клеток, экспрессирующих белок GFP, были выбраны для дальнейших экспериментов.

После оценки эффективности трансфекции и гомологичной рекомбинации, полученные пулы клеток засеивали в селективную среду CD OptiCHO, содержащую 80 мкг/мл гигромицина В. Селективную среду меняли каждые 3 дня на свежую, пока доля живых клеток не достигла 90%. Затем были получены отдельные клоны, у которых оценивали интенсивность флуоресценции GFP и уровень продукции химерного антитела chFVN145 методом ИФА. Отобранные клетки тестировали на устойчивость к зеоцину. При отсутствии устойчивости, в отобранных клетках проводили амплификацию генов, после чего снова получали отдельные клоны. Было проанализировано около 800 клонов, и в результате были отобраны 4 линии клеток с продуктивностью большей, чем 100 мг/л, и с удельной продуктивностью от 2,1 пг/кл/день до 4.0 пг/кл/день.

Отобранные клоны проверяли на стабильность, для этого их культивировали 30 пассажей в среде без селективных маркеров и оценивали их продуктивность с помощью ИФА. Все клоны показали высокую стабильность, уровень продукции химерного антитела chFVN145 снижался не более, чем на 10-15 %. Для наработки химерного антитела в последующих экспериментах использовали клон клеток FRT-3E4-9.

Наработка и очистка химерного антитела против вируса клещевого энцефалита

Для наработки химерного антитела клетки FRT-3E4-9 культивировали в синтетической питательной среде CD FortiCHO, содержащей 6 мМ глутамина и 0,1% декстран сульфата. В течение всего культивирования ежедневно контролировали уровень потребления глюкозы. Для увеличения продолжительности культивирования использовали питательную добавку CD Efficient Feed C в концентрациях 1%, 2% и 3%, которую добавляли ежедневно начиная с 3-4 суток. Результаты сравнения культивирования клона FRT-3E4-9 с использованием разных режимов введения питательной добавки представлены на рисунке 6.

Таким образом, были оптимизированы условия культивирования клона клеток FRT-3E4-9, секретирующего химерное антитело. По результатам ИФА

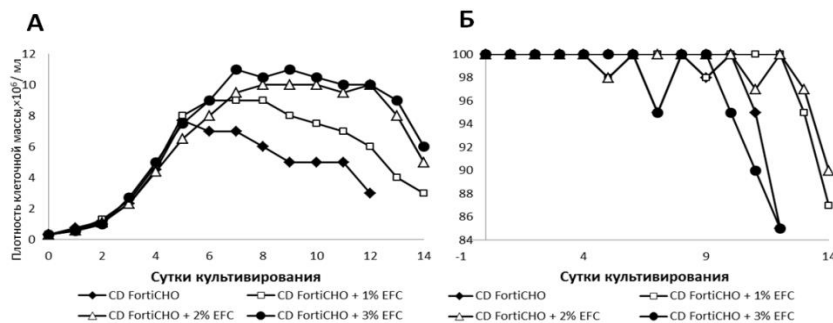


Рис. 6 – Параметры культивирования клона FRT-3E4-9 при разных режимах введения добавки Efficient feed C (А) – график плотности клеток при культивировании; (Б) - график жизнеспособности клеток при культивировании

максимальная продуктивность созданного штамма CHO-S/ FRT-3E4-9 составила 320 мг антитела с 1 л питательной среды при ежедневной добавлении 2% питательной добавки Efficient Feed C.

Оценка иммунохимических свойств антитела chFVN145 против ВКЭ

Для оценки иммунохимических свойств антитела chFVN145 очищали из культуральной среды на сорбенте с белком А. Электрофоретический анализ очищенного антитела chFVN145, обработанного дитиотреитолом, выявил высокую степень чистоты (~95%) и гомогенности препарата, а анализ антитела с неповреждёнными дисульфидными связями подтвердил, что легкие и тяжёлые цепи должным образом объединены в молекулу иммуноглобулина (рис. 7).

Кроме того, методом вестерн-блот анализа подтверждали принадлежность константных доменов очищенного антитела chFVN145 к константным доменам иммуноглобулина человека. Результаты показали, что мкАТ против Fc-фрагмента IgG человека выявляли тяжёлую цепь chFVN145, а поликлональные антитела козы против цельной молекулы IgG человека выявляли как тяжёлые, так и легкие цепи антитела chFVN145 (рис. 7).

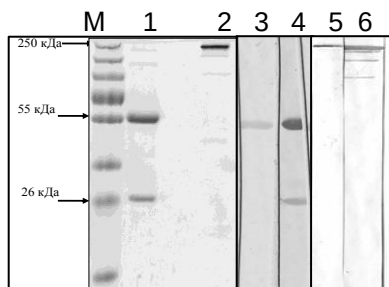


Рис. 7 – Электрофоретический анализ антитела chFVN145 в 12,5% ПААГ с SDS в денатурирующих (1) и неденатурирующих (2) условиях и вестерн-блот анализ chFVN145, проявленного мкАТ мыши против Fc-фрагмента IgG человека (3,5), поликлональными антителами козы против целой молекулы IgG человека (4,6). М - маркер молекулярных масс.

Изучение аффинности антитела chFVN145

На следующем этапе тестировали способность антитела chFVN145 выявлять гликопротеин Е ВКЭ с помощью твердофазного ИФА (рис. 8А). На иммунологическую подложку сорбировали рекомбинантный белок Е (предоставлен к.б.н. Кондратовым И.Г. и д.б.н. Беликовы С.И., ЛИН СО РАН) и анализировали его связывание с последовательными разведениями антитела chFVN145.

Измерение константы связывания антитела chFVN145 с рекомбинантным белком Е проводили методом поверхностного плазмонного резонанса на оптическом биосенсоре ProteOn XPR36. Антитело chFVN145 иммобилизовали на поверхность GLC чипа, а рекомбинантный белок Е использовали в качестве аналита. Результаты эксперимента показали (рис 8Б), что константа диссоциации комплекса «chFVN145-белок Е», рассчитанная как $K_D = k_{off} / k_{on}$, составила $(1,5 \pm 0,2) \times 10^{-9}$ М. Таким образом, антитело chFVN145 продемонстрировало наномолярную аффинность, которая соизмерима со сродством с тем же антигеном полученного ранее протективного антитела [Байков и соав., 2018].

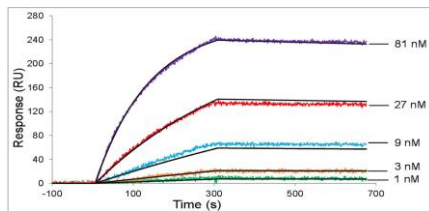
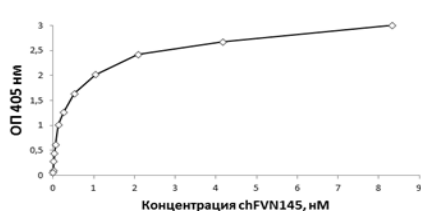


Рис. 8 – Изучение взаимодействия хАТ chFVN145 с рекомбинантным белком гЕ. (А) твердофазный ИФА; (Б) поверхностный плазмонный резонанс

Изучение эпитопной специфичности химерного антитела против ВКЭ с использованием рекомбинантных фрагментов белка Е

В данной работе эпитопное картирование антитела chFVN145 проводили двумя независимыми методами – анализом взаимодействия антитела chFVN145 с укороченными фрагментами белка Е ВКЭ и пептидным картированием с использованием комбинаторных фаговых библиотек случайных пептидов.

Для определения эпитопной специфичности антитела chFVN145 были сконструированы два рекомбинантных белка, содержащих N- и C-концевые части домена D3, rED3delA* (301–359 ако) и rED3delD* (356–397 ако). Фрагменты ДНК, кодирующие рекомбинантные фрагменты белка Е rED3delA* (301 – 359 ако) и rED3delD* (356 – 397 ако), получали в ОТ-ПЦР с использованием в качестве матрицы РНК ВКЭ Софьин (GenBank: AEP20480.1). Полученные ПЦР-фрагменты содержали сайты для эндонуклеаз *NcoI* и *NotI*, введенные в последовательности праймеров. ПЦР-фрагменты обрабатывали рестриктазами *NcoI* и *NotI* и объединяли в реакции лигирования с ДНК плазмиды pHEN2, обработанной теми же рестриктазами. Гены, кодирующие рекомбинантные белки, содержали на С-конце последовательность (His)₆ для очистки белков на Ni-NTA сорбенте.

Полученными результирующими плазмидами pHEN-rED3delA* и pHEN-rED3delD* независимо трансформировали клетки *E. coli* HB2151, находящиеся в стадии экспоненциального роста. Трансформанты высевали на селективную агаризованную среду, и индивидуальные клоны анализировали методом ПЦР на наличие фрагментов ДНК, кодирующих соответствующие рекомбинантные белки. Отобранные клоны культивировали, а лизаты клеток анализировали электрофоретически в 12,5% ПААГ с SDS. Результаты электрофоретического разделения клеточных лизатов подтвердили присутствие белковых бэндов с расчетными молекулярными весами. Таким образом, были получены клетки *E. coli*, продуцирующие рекомбинантные белки rED3delA* и rED3delD*.

Лизаты клеток *E. coli*, продуцирующих укороченные рекомбинантные фрагменты белка Е ВКЭ, rED3delA* и rED3delD*, а также рекомбинантные белки rED1+2 и rED3, полученные ранее аналогично и содержащие соответственно аминокислотные последовательности доменов D1 и D2 (1 – 302 ако) и домена D3 (301 – 397 ако), разделяли электрофоретически и

переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Связывание этих белков с антителом chFVN145 оценивали методом вестерн-блот анализа. В результате было показано, что антитело chFVN145 выявляло рекомбинантный белок rED3 и не взаимодействовало с белком rED1+2 (рис. 9А), следовательно, оно было направлено к домену D3 белка Е ВКЭ. Кроме того, антитело chFVN145 образовывало комплекс с рекомбинантным белком rED3delA* (301-359 ако), содержащим N-концевую часть белка Е ВКЭ и не выявляло с белком rED3delD* (356-397), содержащим С-концевую часть домена D3 (рис. 9).

Таким образом, по результатам связывания антитела chFVN145 с рекомбинантными фрагментами белка Е ВКЭ с достаточной надежностью можно сделать заключение о том, что эпитоп, узнаваемый антителом chFVN145, локализован в N-концевой части домена D3 белка Е ВКЭ, и в связывании с антителом chFVN145 принимают участие ако белка Е ВКЭ, находящиеся между 301 и 359 положением

Эпитопное картирование хАТ chFVN145 с использованием комбинаторных пептидных библиотек

С целью более точного картирования эпитопа, узнаваемого антителом chFVN145, был использован другой способ картирования, основанный на методологии фагового дисплея. Эта методология позволяет в ходе процедуры аффинной селекции отобрать целевые аминокислотные последовательности пептидов и белков из огромных репертуаров однотипных, но различающихся последовательностей. В нашем случае необходимо было из комбинаторных фаговых библиотек случайных пептидов отобрать с помощью аффинной селекции пептиды, специфически связываемые антителом chFVN145, и сравнить их последовательность с последовательностью белка Е ВКЭ.

В работе использовали комбинаторные библиотеки Ph.D.-12 и Ph.D.-C7C (New England Biolabs, США). Обе библиотеки независимо обогащали фагами, связываемыми антителом chFVN145, в ходе двух раундов биопэннинга. Соответствующие разведения обогащенных библиотек Ph.D.-12 и Ph.D.-C7C, полученных после второго раунда биопэннинга, использовали для независимой трансфекции клеток *E. coli* ER2738, которые высевали для образования индивидуальных колоний. Фаги, экспонирующие пептиды, которые были отобраны по связыванию с антителом chFVN145, выделяли из индивидуальных колоний, нарабатывали и проверяли специфичность их связывания с антителом chFVN145 методом твердофазного ИФА. Всего таким образом было проанализировано по 285 бактериофагов из каждой библиотеки.

Для фагов, продемонстрировавших хорошее связывание с антителом chFVN145, секвенировали участок фагового генома, кодирующий экспонированный случайный пептид. Среди выведенных аминокислотных последовательностей только три различных пептида, отобранных из библиотеки Ph.D.-12, имели мотивы, сходные с доменом D3; из пептидов, отобранных из библиотеки Ph.D.-C7C, только шесть имели D3-подобные мотивы (рис. 9).

Все эти пептиды локализовались внутри последовательности рекомбинантного белка rED3delA* на участке, находящемся между 307 и 348

ако белка Е ВКЭ, что хорошо согласуется с результатами, полученными с помощью рекомбинантных фрагментов белка Е ВКЭ.

Согласно полученным результатам, в домене D3 белка Е можно выделить три потенциальных сайта, ответственных за взаимодействие с антителом chFVN145: сайт 1 (307-313 ако); сайт 2 (333-338 ако); сайт 3 (341-348 ако). По классификации вторичных структур белка Е, сделанной по результатам рентгеноструктурного анализа белка Е ВКЭ [Rey et al., 1995], сайт 1 локализован на петле А, сайт 2 – на петле ВС, а сайт 3 – на β-тяже С. Сайты 1 и 2 находятся на поверхности белка Е и доступны для антител; сайт 3 скрыт внутри белка и, вероятно, не доступен для взаимодействия с антителами (рис. 9).

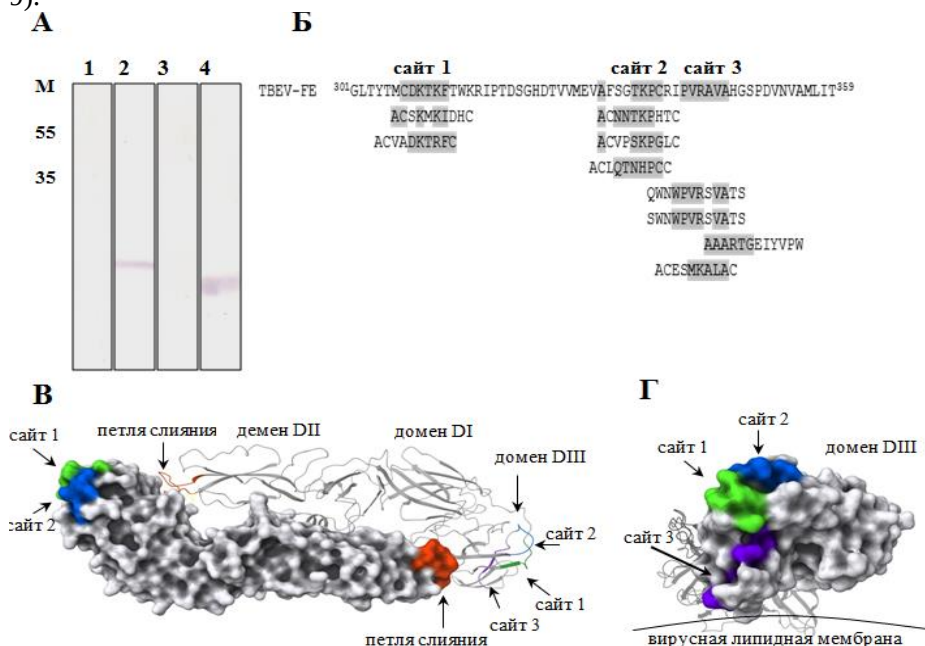


Рис.9 – А. Вестерн-блот анализ лизатов клеток *E. coli*, экспрессирующих белки rED1-2 (1), rED3 (2), rED3delD + (3) и rED3delA + (4), фракционированные электрофоретически в 12,5% ПААГ и проявленные антителом chFVN141. Б. Результаты скрининга фаговой библиотеки пептидов, взаимодействующих с антителом chFVN141. Вывравнивание гомологичных фрагментов гликопротеина Е ВКЭ и пептидов, отобранных из библиотеки Ph.D.-12 и библиотеки Ph.D.-C7C. В. Ленточное и поверхностное представление структуры димера гликопротеина Е ВКЭ (PDB 1svb) с указанными предполагаемыми эпитопными сайтами. Вид с внешней поверхности вириона. Г. Ленточное и поверхностное представление предполагаемых эпитопных сайтов, вид со стороны домена D3 гликопротеина Е. Молекулярные координаты для гликопротеина Е ВКЭ (PDB 1svb), используемой в структурном анализе, были получены из банка данных белков, а затем визуализированы с использованием программного обеспечения PyMol.

Таким образом, с помощью двух разных методов впервые локализован эпитоп протективного антитела chFVN145; вероятно во взаимодействии с антителом chFVN145 участвуют ако, локализованные на петлях А и ВС, находящихся в N – концевой части домена D3 белка Е ВКЭ (307-338 ако).

Изучение противовирусных свойств антитела chFVN145

Исследование способности антитела chFVN145 обеспечивать постконтактную профилактику ВКЭ у зараженных мышей

Протективную активность антитела chFVN145 исследовали в периферической мышечной модели, описанной ранее [Тимофеев и др., 2001]. Для этого шесть групп мышей заражали интраперитонеально (и/п) ВКЭ штамм Абсеттаров в дозе 158,5 ЛД₅₀, в 200 мкл. Через 24 часа после заражения мышам из двух групп однократно внутримышечно (в/м) вводили антитело chFVN145 в дозировках 100 мкг/мышь (группа 1) и 10 мкг/мышь (группа 2); еще двум группам мышей вводили в/м коммерческий препарат анти-ВКЭ ИГ (НПО «Микроген») в дозировках 100 мкг/мышь (группа 3) и 10 мкг/мышь (группа 4); пятой группе мышей вводили 100 мкл 0,9% раствора NaCl; мышам из шестой (контрольной) группы не вводили ничего. Результаты эксперимента (рис. 10А) подтвердили наличие протективной активности у антитела chFVN145, которое в дозировке 100 мкг/мышь обеспечило 100% выживаемость экспериментальных животных, а в дозировке 10 мкг/мышь – 50% выживаемость.

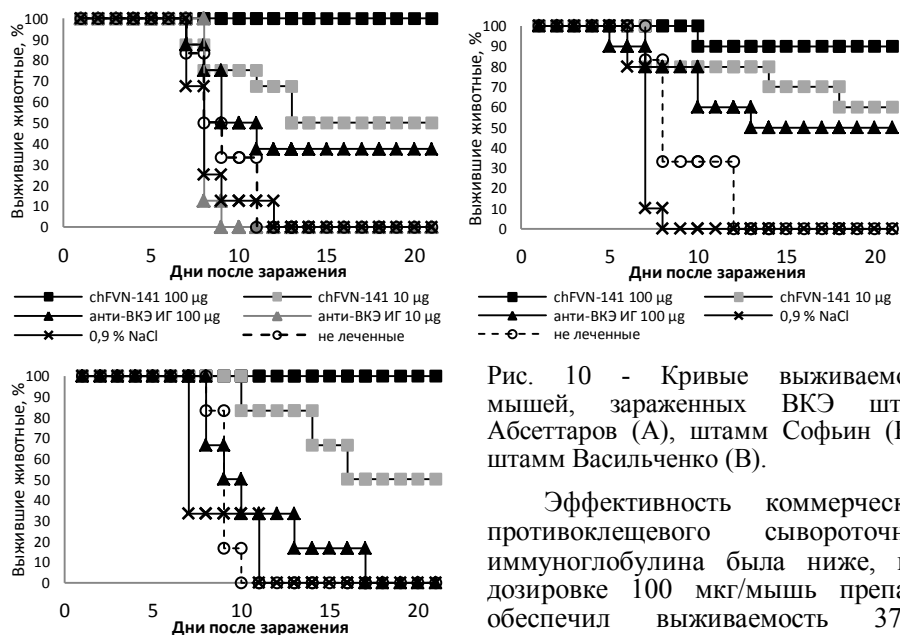


Рис. 10 - Кривые выживаемости мышей, зараженных ВКЭ штамм Абсеттаров (А), штамм Софин (Б) и штамм Васильченко (В).

Эффективность коммерческого противоклещевого сывороточного иммуноглобулина была ниже, и в дозировке 100 мкг/мышь препарат обеспечил выживаемость 37,5% мышей, а в дозировке 10 мкг/мышь он был неэффективен. В контрольной группе и в группе мышей, которым вводили 0,9% раствор NaCl, все животные погибли.

По аналогичной схеме были проведены эксперименты с мышами, зараженными независимо ВКЭ штамм Софьин и ВКЭ штамм Васильченко в инфицирующих дозах 231 ЛД₅₀ и 251 ЛД₅₀, соответственно. Результаты эксперимента продемонстрировали наличие у антитела chFVN145 выраженного протективного эффекта (рис. 10Б, 10В); в дозировке 100 мкг/мышь оно обеспечило защиту 90% и 100% мышей, инфицированных ВКЭ Софьин, и ВКЭ Васильченко, соответственно. Как и в случае заражения мышей ВКЭ Абсеттаров, введение антитела chFVN145 в низкой дозировке (10 мкг/мышь) обеспечило выживаемость 60% и 50% мышей, инфицированных соответственно ВКЭ Софьин и ВКЭ Васильченко. Коммерческий препарат сывороточного иммуноглобулина и в этих экспериментах продемонстрировал более низкие защитные свойства, чем антитело chFVN145.

Поскольку ВКЭ Софьин, ВКЭ Васильченко и ВКЭ Абсеттаров являются прототипными штаммами основных субтипов ВКЭ – Дальневосточного, Сибирского и Европейского, можно с достаточно степенью надежности предположить, что антитело chFVN145 обладает способностью защищать мышей от введения летальных доз изолятов ВКЭ, принадлежащих к различным субтипам, при этом защитные свойства антитела chFVN145 практически не зависят от субтипа ВКЭ, использовавшегося для заражения.

Исследование терапевтической эффективности антитела chFVN145 на мышинной модели

На следующем этапе была протестирована способность антитела chFVN145 защищать мышей, зараженных летальными дозами ВКЭ разных субтипов, при однократном введении этого антитела через одни, двое или трое суток (+1, +2, и +3). Общая схема эксперимента соответствовала предыдущим экспериментам.

Восемь групп мышей заражали и/п ВКЭ Абсеттаров (рис. 11А) и через одни, двое или трое суток мышам в/м вводили 100 мкг/мышь или 10 мкг/мышь антитела chFVN145. Контрольным группам в эти же дни вводили 0,9% раствор NaCl или не вводили ничего. Из полученных результатов видно, что введение антитела chFVN145 в дозировке 100 мкг/мышь показало хороший терапевтический эффект: при введении этой дозировки через одни, двое или трое суток после заражения выжило 100%, 85,5% и 37,5% мышей, соответственно (рис. 18А). Даже введение низкой дозировки антитела chFVN145 увеличило СПЖ мышей - 20 ± 2.8 , 13.5 ± 6.3 и 10.9 ± 6.3 дней при введении через одни, двое или трое суток после заражения, соответственно. Следует отметить, что статистически достоверным увеличение СПЖ при введении антитела chFVN145 в дозировке 10 мкг/мышь по сравнению с СПЖ в контрольных группах (10.2 ± 3.9 , NaCl и 9.8 ± 4.5 без лечения) было только в случае введения антитела через сутки после заражения.

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали, что даже однократное введение антитела chFVN145 увеличивало продолжительность жизни зараженных мышей. Терапевтическая эффективность антитела chFVN145 зависела от дозы ВКЭ, использованного для заражения животных.

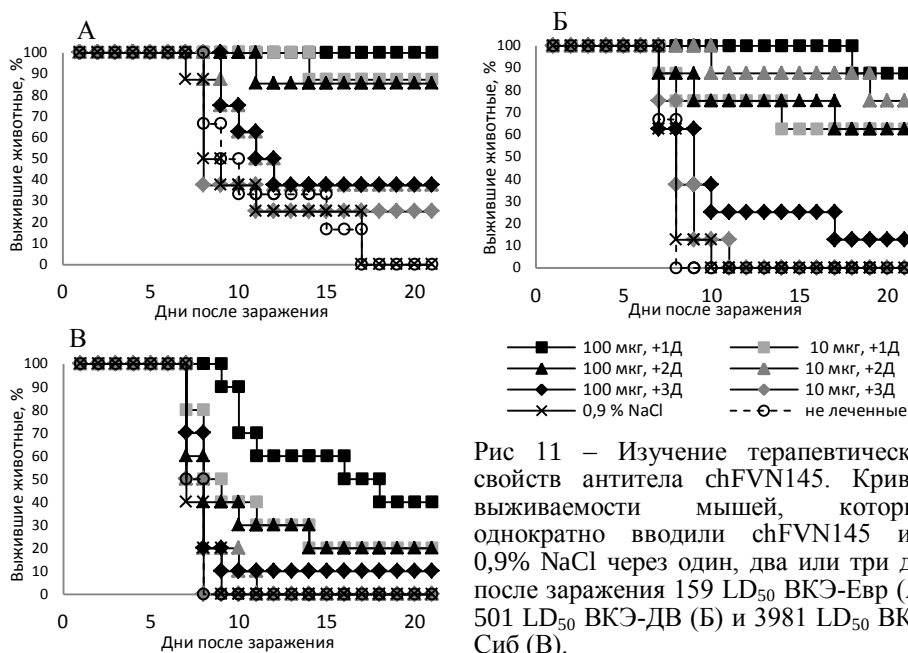


Рис 11 – Изучение терапевтических свойств антитела chFVN145. Кривые выживаемости мышей, которым однократно вводили chFVN145 или 0,9% NaCl через один, два или три дня после заражения 159 LD₅₀ BKЭ-Евр (А), 501 LD₅₀ BKЭ-ДВ (Б) и 3981 LD₅₀ BKЭ-Сиб (В).

Подтверждение отсутствия опосредованного антителом chFVN145 усиления инфекции *in vivo*

При разработке иммунологических препаратов против флавивирусов При разработке иммунологических препаратов против флавивирусов необходимо тщательно исследовать возможность антитело-зависимого усиления инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE), поскольку такое усиление инфекции было обнаружено в экспериментах *in vitro* на клетках, инфицированных различными флавивирусами [Bröker и Kollaritsch, 2008; Halstead и O'Rourke, 1977; Kreil et al., 1997; Nelson et al., 2008]. Считают, что ADE-эффект возникает при наличии в препарате антител, не обладающих вируснейтрализующими или протективными свойствами, или введении субнейтрализующих доз вируснейтрализующих антител [Bröker и Kollaritsch, 2008; Huisman et al., 2009]. Следует подчеркнуть, что эффект ADE не был зафиксирован для BKЭ в экспериментах *in vivo* [Bröker и Kollaritsch, 2008; Kreil et al., 1997]. Однако, именно опасения, связанные с тем, что пассивная иммунизация противоклещевыми иммуноглобулинами может усилить инфекцию, привели к тому, что было приостановлено производство высокоэффективного препарата противоклещевого иммуноглобулина FSME-Bulin. В связи с этим, было проведено исследование возможности появления ADE эффекта при введении антитела chFVN145 в экспериментах *in vivo*.

На первом этапе определяли суб-протективную дозу антитела chFVN145. Мышам, зараженным и/п BKЭ Абсеттаров в дозе 199,5 LD₅₀, через сутки после заражения вводили антитело chFVN145 в дозировках 40 мкг/мышь (группа 1), 4 мкг/мышь (группа 2) и 0,4 мкг/мышь (группа 3). Контрольным

группам мышей вводили 0,9% NaCl или не вводили ничего. Результаты эксперимента показали, что выживаемость мышей увеличилась при введении антитела chFVN145 в дозировках 40 мкг/мышь и 4 мкг/мышь (рис. 12А). При введении 0,4 мкг/мышь антитела 100% мышей в группе 3 погибло, как и в обеих контрольных группах, т.е. дозировка 0,4 мкг/мышь была суб-протективной. Важно, что средний период жизни у мышей, леченных суб-протективной дозой антитела не уменьшился по сравнению с контрольными группами.

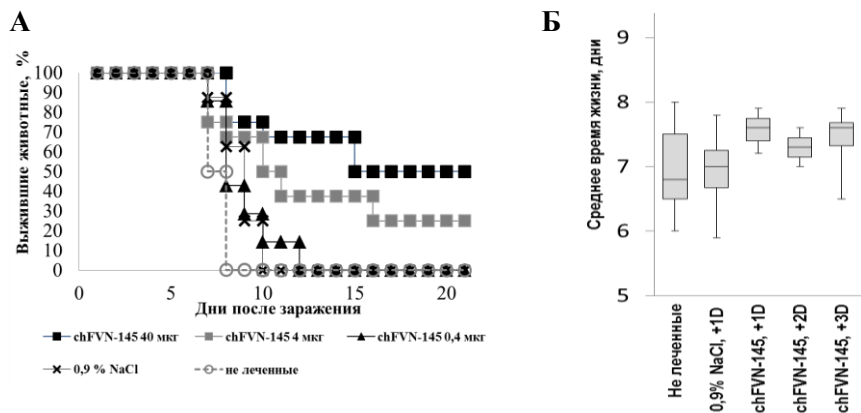


Рис. 12 Влияние суб-протективных доз антитела chFVN145. А: Кривые выживаемости мышей, зараженных 199,5 LD₅₀ ВКЭ Абсеттаров. Б: Усредненные величины СПЖ в группах мышей, зараженных ВКЭ, со 100%-ной смертностью. Приведены средние значения с разбросом и среднеквадратичными отклонениям

Аналогичные эксперименты были дополнительно повторены при введении антитела chFVN145 через день после заражения различными дозами ВКЭ, а также проведены в нескольких повторах при использовании антитела chFVN145 через 2 и 3 дня после заражения. В каждом случае учитывались величины СПЖ только в тех группах мышей, в которых после введения антитела регистрировалась 100% гибель мышей. Суммированные данные приведены на рисунке 20. Усредненные величины СПЖ сравнивали с усредненными величинами СПЖ в контрольных группах (зараженным мышам вводили 0,9% NaCl или не вводили ничего), в которых летальность всегда достигала 100%. Из представленных результатов видно, что усредненные значения СПЖ мышей, получивших однократно суб-протективную дозу антитела chFVN145 через один, два и три дня после заражения, были выше, чем усредненные значения СПЖ в контрольных группах, хотя превышение было статистически не достоверным. Тем не менее, СПЖ, по крайней мере, не снижалось в группах мышей, которым вводили субпротективные дозы chFVN145 (рис. 12Б).

Таким образом, в проведенных экспериментах на мышинной модели не удалось обнаружить антитело-опосредованное усиление КЭ при введении мышам суб-протективных доз антитела chFVN145.

Недавно был обнаружен новый механизм ADE флавивирусных инфекций, который основан на конформационных изменениях белка Е, вызванных взаимодействиями некоторых антител с этим белком, приводящих к увеличению доступности петли слияния, которая обычно спрятана внутри белка Е [Haslwanter et al., 2017]. Как правило, антитела, вызывающие ADE по такому механизму, взаимодействуют с белком Е в области петли слияния. Очевидно, что подобные антитела не могут рассматриваться в качестве потенциальных терапевтических препаратов. Важно, что по результатам 3D-моделирования эпитоп, узнаваемый антителом chFVN145, находится вдали от петли слияния. Полученные результаты эпитопного картирования, показавшие отсутствие связывания антитела chFVN145 с петлей слияния или в области, прилегающей к ней, подтверждаются отсутствием антитело-зависимого усиления инфекции при введении антитела chFVN145 в проведенных нами экспериментах *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основываясь на полученных в данной работе результатах можно сделать заключение о высоком терапевтическом потенциале разработанного антитела chFVN145.

ВЫВОДЫ

1. Создан оригинальный суспензионный штамм CHO-S/FRT, в геноме которого сайты гомологичной рекомбинации введены в транскрипционно активные участки хроматина. На основе штамма CHO-S/FRT и сконструированной кассетной плазмиды, несущей FRT-сайт и участки для удобного встраивания иммуноглобулиновых генов, разработан штамм-продуцент CHO-S/FRT-3E4-9, обеспечивающий стабильную продукцию химерного антитела chFVN145 против вируса клещевого энцефалита с продуктивностью 320 мг/л.

2. Определено значение константы связывания антитела chFVN145 с рекомбинантным белком Е вируса клещевого энцефалита, составившее $K_D = (1,5 \pm 0,2) \times 10^{-9}$ М.

3. С помощью рекомбинантных фрагментов белка Е вируса клещевого энцефалита и комбинаторных пептидных библиотек показано, что протективное антитело chFVN145 специфически взаимодействуют с N-концевым регионом домена D3 этого белка, и в связывании участвуют аминокислотные остатки с 307 по 313 и с 333 по 338, находящиеся на петлях в этом регионе.

4. Установлено, что антитело chFVN145 обладает протективными свойствами в отношении штаммов Дальневосточного, Сибирского и Европейского субтипов вируса клещевого энцефалита в мышинной модели заболевания; протективная активность продемонстрирована при однократном введении антитела при экстренной профилактике и терапевтическом применении.

5. Показано, что введение мышам суб-протективных доз антитела chFVN145 через 1, 2 и 3 дня после заражения вирусом клещевого энцефалита не уменьшило среднюю продолжительность жизни мышей в сравнении с контрольными животными, которым антитело не вводили.

Список основных публикаций по теме диссертации

1. **Matveev A.**, Kozlova I., Stronin O., Khlusevich Y., Doroshchenko E., Baykov I., Lisak O., Emelyanova L., Suntsova O., Matveeva V., Savinova J., Tikunova N. Post-exposure administration of chimeric antibody protects mice against European, Siberian, and Far-Eastern subtypes of tick-borne encephalitis virus. PLoS ONE. – 2019;14(4):e0215075.
2. Ruzek D., Županc T.A., Borde J., Chrdle A., Eyer L., Karganova G., Kholodilov I., Knap N., Kozlovskaya L., **Matveev A.**, Miller A., Osolodkin D., Överby A., Tikunova N., Tkachev S., Zajkowska J. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. Antivir Res. –2019;164:23-51.
3. Байков И., Емельянова Л., Соколова Л., Карелина Е., **Матвеев А.**, Бабкин И., Хлусевич Я., Подгорный В., Тикунова Н. Анализ доменной специфичности протективного химерного антитела СН14D5А против гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):459-467.
4. **Матвеев А.**, Хлусевич Я., Байков И., Бабкин И., Гончарова Е., Морозова В., Тикунова Н. Создание стабильного штамма-продуцента полноразмерного антитела человека на примере антитела против вируса экстремелии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(8):993-1000.