

На правах рукописи

Дубровская Виктория Владиславовна

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ИММУННОЙ КОМБИНАТОРНОЙ
БИБЛИОТЕКИ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА И ОТБОР
ИЗ НЕЕ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ
ОРТОПОКСВИРУСОВ**

03.00.03 – «молекулярная биология»

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Кольцово – 2006

Работа выполнена в ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора Минздравсоцразвития России.

Научный руководитель
кандидат биологических наук, доцент Н.В. Тикунова

Официальные оппоненты
доктор биологических наук, профессор В.Б. Локтев
кандидат биологических наук, доцент Н.А. Попова

Ведущая организация
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, Москва

Защита состоится «28» декабря 2006 г. в 9 часов на заседании
диссертационного совета при ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» по адресу: ГНЦ ВБ
«Вектор», Кольцово Новосибирской области, 630559, тел. (8-383) 336-74-28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного
научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор».

Автореферат разослан «23» ноября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Э.Г. Малыгин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Благодаря своей высокой специфичности и широкому спектру связываемых антигенов, антитела нашли широкое применение в фундаментальных исследованиях, медицине и биотехнологии. Но, если в качестве диагностических и аналитических реагентов антитела применяются уже давно и довольно успешно, то применение антител в терапии связано с рядом проблем. Несмотря на разнообразие, только ограниченный набор антител обладает свойствами, подходящими для подобного использования. Так, терапевтические антитела не должны быть иммуногенны и должны иметь длительный период полувыведения из организма человека. К тому же необходимо, чтобы они были устойчивы к агрегации, precipitation и действию протеаз. В соответствии с применением должны учитываться и другие свойства антител: размер, аффинность, эффекторная функция и способность проникать в ткани. Кроме того, необходимо наличие способа их наработки в препаративных количествах.

Открытие Kohler и Milstein гибридной технологии в 1975 году позволило нарабатывать моноклональные антитела грызунов разной специфичности. С тех пор гибридомы стали основным источником моноклональных антител (МАТ), использующихся в фундаментальных исследованиях и в биотехнологии при создании тест-систем. Но при использовании мышиных МАТ в терапии оказалось, что они имеют ряд недостатков, среди которых короткий период полувыведения, недостаточная активация эффекторных функций и, главное, развитие у человека иммунного ответа против мышиных антител, особенно при повторном использовании. Для решения этих проблем были разработаны стратегии, позволяющие с помощью методов генетической инженерии избегать нежелательного иммунного ответа: создание химерных антител путем соединения переменных доменов АТ мыши с константными доменами человеческих АТ, «гуманизация» путем замены CDR и удаление Т-хелперных эпитопов из состава молекулы антитела. Уменьшить степень иммунного ответа, направленного против антител, позволило также использование антител приматов.

Тем не менее, полностью человеческие МАТ наиболее ценны для терапевтического применения, поэтому было разработано несколько подходов к их получению из различных источников — человеческих гибридом, трансгенных мышей и *in vitro* библиотек. Однако, получать стабильные линии человеческих гибридом, продуцирующих высокоаффинные МАТ, удается очень редко по причине отсутствия подходящей клеточной линии человеческой мисомы. Еще одним способом получения МАТ человека стали трансгенные мыши, у которых собственные гены иммуноглобулинов заменены на человеческие. Но при таком подходе, как и при получении МАТ человека с помощью

гибридной технологии, набор антигенов, против которых могут быть получены антитела ограничен только теми антигенами, которые могут быть использованы для иммунизации, при этом невозможно получить необходимые в терапии антитела против собственных белков человека. Спектр антигенов может быть практически неограничен, если в качестве источника антигенсвязывающих доменов антител использовать комбинаторные библиотеки. В этом случае антигенсвязывающий сайт антитела желаемой специфичности отбирается из огромных репертуаров фрагментов антител, которые экспонированы на поверхности бактериофагов либо с помощью других дисплейных технологий – на рибосомах или дрожжах. При этом существуют различные подходы к созданию комбинаторных библиотек, и выбор того или иного подхода зависит от конкретной задачи.

В последнее время все чаще технологию фагового дисплея стали применять для отбора рекомбинантных антител с целью получения на их основе терапевтических препаратов для лечения инфекционных заболеваний. Кроме того, такие антитела также используют для исследования антигенной природы различных вирусов.

Одними из наиболее многочисленных и сложноорганизованных представителей царства *Vira* являются поксвирусы, которые поражают практически все известные таксономические группы животных, начиная от насекомых и кончая млекопитающими, в том числе и человека, при этом большая часть патогенных для человека поксвирусов относится к роду Ортопоксвирусов. Наиболее патогенными для человека являются вирус натуральной оспы (ВНО), кроме того, генерализованную инфекцию может также вызывать вирус оспы обезьян. Известно, что вакцинация вирусом осповакцины (ВОВ), ранее использованная для ликвидации натуральной оспы, приводит к формированию у вакцинированных людей длительного состояния напряженности иммунитета. Но высокий процент осложнений, возникающих в результате классического оспопрививания, особенно у людей с врожденным или приобретенным иммунодефицитом, делает необходимым разработку новых специфических средств профилактики поствакцинальных осложнений. В настоящее время таким средством является сывороточный вакцинный иммуноглобулин (VIG), тем не менее, его применение сопровождается биологическим риском. Альтернативой VIG могли бы быть протективные моноклональные АТ человека против ортопоксвирусов.

Целью данной работы являлось конструирование иммунной комбинаторной фаговой библиотеки scFv антител человека против ортопоксвирусов, отбор из нее вируснейтрализующих антител и исследование их иммунохимических свойств.

Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- сконструировать и охарактеризовать комбинаторную иммунную библиотеку одноцепочечных антител человека на основе мРНК лимфоцитов периферической крови доноров, предварительно вакцинированных вирусом осповакцины;
- отобрать из сконструированной библиотеки вируснейтрализующие scFv антитела, специфичные к рекомбинантному белку ргA30L вируса натуральной оспы, и исследовать их связывание с этим антигеном;
- отобрать из комбинаторной иммунной библиотеки вируснейтрализующие scFv антитела, специфичные к вирусу оспы коров, и исследовать их иммунохимические свойства;
- определить белок-мишень для вируснейтрализующих scFv антител, специфичных к вирусу оспы коров;
- определить аминокислотные последовательности отобранных одноцепочечных антител.

Научная новизна и практическая ценность работы. В настоящей работе впервые сконструирована иммунная комбинаторная библиотека одноцепочечных антител человека против ортопоксвирусов. Из сконструированной библиотеки впервые отобраны одноцепочечные антитела человека, специфичные к рекомбинантному белку вируса натуральной оспы ргA30L, способные нейтрализовать вирус осповакцины. Получена панель вируснейтрализующих одноцепочечных антител человека против вируса оспы коров. Сконструирован штамм *Escherichia coli*, продуцирующий рекомбинантный белок ргJ3L вируса оспы коров (штамм Гришак). Показано, что 8 из 10 вируснейтрализующих антител специфически взаимодействуют с рекомбинантным белком ргJ3L, а также с его природными аналогами в составе вирионов вируса оспы коров, осповакцины и экстремелии. Получен штамм *Escherichia coli*, продуцирующий растворимое одноцепочечное антитело b9, специфически взаимодействующее с вирусом оспы коров. Определена константа аффинности одноцепочечного антитела b9. Определены аминокислотные последовательности всех полученных антител.

Поскольку в данной работе получены антигенсвязывающие домены антител человека, на их основе в дальнейшем могут быть сконструированы полноразмерные антитела человека. Такие полноразмерные антитела человека, после проверки их противовирусных свойств в модельных экспериментах на животных, могли бы представлять интерес для создания на их основе иммунопрофилактических средств, а

также терапевтических препаратов предупреждения поствакцинальных осложнений и, возможно, лечения ортопоксвирусных инфекций.

Апробация работы и публикации. По материалам диссертации опубликовано 2 статьи, получено положительное решение о выдаче авторского свидетельства. Материалы диссертации были представлены на 7 Международных конференциях: 6th, 7th и 8th Meetings of the WHO Advisory Committee on Variola Virus Research (Женева, Швейцария, 2004, 2005 и 2006), 18-ой Международной конференции "Antiviral research" (Барселона, Испания, 2005), 7th John Humphrey advanced summer programme in immunology the interface between immunology and medicine (Москва, Россия, 2005), Международная конференция «Физико-химическая биология» (Новосибирск, Россия, 2006), Международная конференция "Basic Science for Biotechnology and Medicine" (Новосибирск, Россия, 2006); и 2 Российских конференциях: III Российская научная конференция с международным участием «Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера» (Новосибирск, Россия, 2006), VII Межгосударственная научно-практическая конференция (Оболensk, Россия, 2006).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста, включая 43 рисунка и 3 таблицы, и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы (140 наименований).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Конструирование и характеристика библиотеки

В качестве источника генетического материала для конструирования библиотеки была использована мРНК клеток лимфоидного ряда четырех доноров, недавно вакцинированных ВОВ, причем двое из них были вакцинированы первично, а двое ревакцинированы. Забор крови проводили у каждого донора при явном проявлении гуморального иммунного ответа: у ревакцинированных доноров – через две недели, при этом титр сывороток составлял 1:25600, а у впервые вакцинированных кровь отбирали недель позже, и титр сывороток составлял 1:6000-8000. Исследование специфичности антител, находящихся в сыворотках крови доноров, вакцинированных ВОВ, показало, что в сыворотках, полученных от трех доноров, присутствовали АТ против белка ортопоксвирусов с молекулярной массой около 35 кДа, в сыворотках двух доноров присутствовали АТ, связывающие белок молекулярной массой около 14 кДа (рис. 1). Антитела исследуемых сывороток связывались также и с другими белками ортопоксвирусов с молекулярными массами 27, 32, 39, 62, 94 кДа.

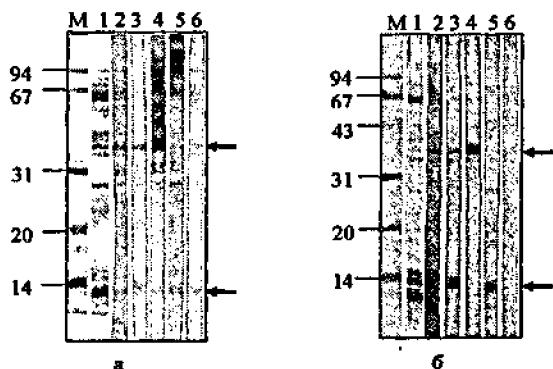


Рис. 1. Иммуноблоттинг белков BOW (а) и вируса оспы коров (б) с сыворотками доноров, вакцинированных впервые (2 и 3), с сыворотками ревакцинированных доноров (4 и 5) и с сывороткой невакцинированного донора (6). М – маркер молекулярных масс белков, 1 – белковые профили соответствующих вирусов.

При амплификации VH- и VL-генов был использован набор праймеров, комплементарных концам V-генов тяжелых и легких цепей. Выбор олигонуклеотидов для амплификации был обусловлен первичной структурой V_H и V_L доменов. Ввиду относительно высокой консервативности участков FR1 и 3'-областей J-сегментов, соответствующие им олигонуклеотиды могут быть использованы в качестве праймеров для амплификации VH- и VL-генов. Набор используемых праймеров был ограничен в пользу тех олигонуклеотидов, которые позволяют амплифицировать гены переменных доменов семейства, наиболее широко представленных в организме человека. Кроме того, V_H и V_L домены выбранных структурных семейств в составе одноцепочечных антител обладают большей термодинамической стабильностью по сравнению с остальными и эффективно экспрессируются в различных прокариотических и эукариотических системах. Таким образом, мы рассчитывали увеличить содержание стабильных антител в конструируемой библиотеке, которые преобладают по сравнению с остальными типами АТ, в норме циркулирующих в крови человека.

Объединение ДНК фрагментов переменных доменов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов в последовательности, кодирующие scFv АТ человека, было проведено с использованием линкерного олигонуклеотида, содержащего сайт для эндонуклеазы рестрикции *Apa*LI. Сайт рестрикции был введен в последовательность линкерного праймера с целью оптимизации процесса сборки scFv-генов (рис. 2).

Используя ПЦР, сначала линкер достраивали последовательностями, кодирующими 3'-концы VH-генов, а затем объединяли с VH-генами, при этом праймеры содержали сайт для эндонуклеазы рестрикции *Sfi*I на 5'-конце. В случае легких цепей, уже

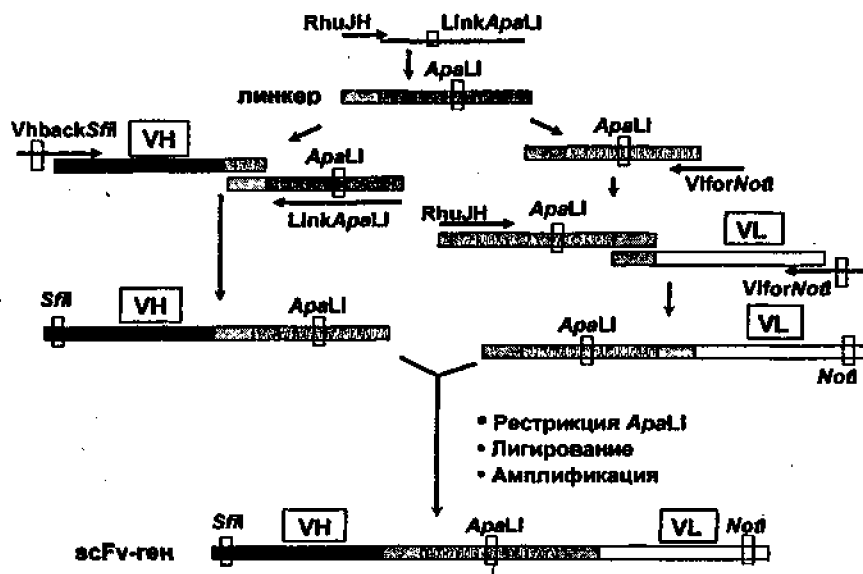


Рис. 2. Схема конструирования генов, кодирующих одноцепочечные антитела человека. На схеме показаны: VH- и VL-гены; сайты для эндонуклеаз рестрикции *ApaLI*, *SfiI*, и *NotI*; места отжига праймеров *RhuJH*, *VhbackSfiI*, *VlforNotI* и *LinkApaLI*.

достроенный с 3'-конца линкер удлиняли последовательностями, комплементарными 5' концам VL-генов, а затем объединяли с VL-генами, при этом с помощью праймеров вводили сайт рестрикции *NotI* на 3' конце. Полученные таким образом фрагменты ДНК после экстракции из агарозного геля обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *ApaLI* и объединяли в реакции лигирования. Затем гены, кодирующие одноцепочечные антитела человека (около 800 п.н.), амплифицировали с использованием праймеров, содержащих сайты рестрикции *SfiI* и *NotI*. Полученный репертуар scFv-генов встраивали в векторную фагмиду pHEN2 (рис. 3).

После этого полученный репертуар фагмид использовали для трансформации клеток *E. coli* TG1. Выбранный для создания библиотеки вектор относится к 3+3 фагмидным векторным системам, в которых дикий тип белка pIII конкурирует с химерным белком pIII, содержащим вставку фрагмента антитела, при включении в фаговую частицу. В получаемой в результате амплификации библиотеки фаговой популяции фаговые частицы экспонируют только одну копию фрагмента антитела. Так

называемый моновалентный дисплей широко используется для отбора высоко аффинных фрагментов антител.

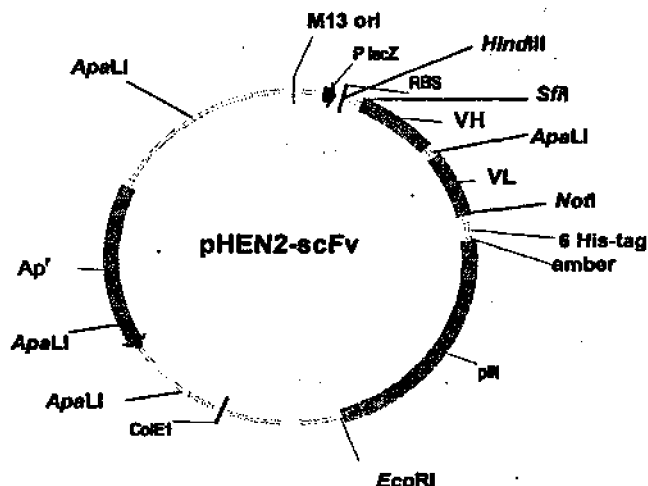


Рис. 3. Схема фагмиды pHEN2-scFv, содержащей ген одноцепочечного антитела. Указаны сайты для эндонуклеаз рестрикции *HindIII*, *SfiI*, *ApaLI*, *NotI* и *EcoRI*; промотор лактозного оперона *P lacZ*; место посадки рибосом (RBS); гены вариабельных доменов тяжелых (VH) и легких (VL) цепей иммуноглобулинов, супрессируемый стоп кодон *amber* TAG; фрагмент гена белка pIII; ori репликации *ColE1*; ori фага M13; *Ap'*- ген устойчивости к ампициллину.

Размер сконструированной иммунной библиотеки составил 3×10^7 независимых клонов. Был также оценен функциональный размер библиотеки, т.е. процент клонов, содержащих правильно собранные scFv-гены, способные продуцировать индивидуальные молекулы одноцепочечных антител. Функциональный размер всегда меньше исходного, определенного с помощью подсчета количества независимых трансформантов непосредственно после электропорации, но именно он определяет возможность отбора из библиотеки антител с определенными свойствами. Фагмидная ДНК из 40 случайно выбранных клонов была использована в качестве матрицы для амплификации scFv-генов. Было показано, что фагмидные ДНК, выделенные из 39 клонов, содержали вставки, по размеру совпадающие с scFv-генами. Разнообразие представленных в библиотеке антител оценивали с помощью ПДРФ-анализа scFv-генов 20 случайно выбранных клонов. Для каждого из них наблюдали уникальную картину рестрикции. Кроме этого оценивали процент антител, которые могут быть получены в виде индивидуальных молекул без

оболочечного белка бактериофага. Western-блот анализ клеточных лизатов отдельных клонов показал, что 10 из 10 клонов действительно продуцировали scFv AT.

Таким образом, функциональный размер библиотеки составил не менее 97% от определенного первоначально. Такой размер библиотеки позволяет получать AT с константами аффинности от 5×10^5 до $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Тот факт, что в нашем случае была сконструирована иммунная библиотека, позволяет надеяться, что аффинность отбираемых из нее антител может быть выше, поскольку для конструирования использовали мРНК лимфоцитов вакцинированных доноров, в ходе развития иммунного ответа которых происходило повышение аффинности антител, специфичных к ортопоксвирусам.

Отбор антител против рекомбинантного белка ргA30L

Очень важным моментом при использовании методологии фагового дисплея является выбор антигена для аффинного обогащения библиотеки. Одним из антигенов, использованных в данной работе был рекомбинантный белок ргA30L (Ратунов и др., 2005), любезно предоставленный Гилевой И.П. (Лаборатория геномных исследований ортопоксвирусов и разработки вакцин нового поколения, ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Этот белок является аналогом поверхностного белка слияния ВНО (штамм Инд-3а), закодированным в ОРТ A30L. ргA30L гомологичен белку слияния ВОВ массой 14 кДа, закодированному в гене A27L, был выбран для обогащения библиотеки, поскольку он играет важную роль в жизненном цикле вируса: он участвует в процессах присоединения вируса к клетке-мишени, слияния вирусной и клеточной мембран и высвобождения вирусных частиц. Белок 14 кДа расположен на поверхности внутриклеточного зрелого вируса (IMV), самой многочисленной формы вируса. Он играет важную роль в формировании иммунного ответа хозяина, стимулируя клеточный и гуморальный иммунный ответ. Среди ортопоксвирусов этот белок консервативен, основные различия, выраженные точечными мутациями, сосредоточены в районе 26-40 а.о., и как раз в этом районе локализованы 4 вируснейтрализующих эпитопа. Ранее было показано, что использованный нами рекомбинантный белок ргA30L, подобно природному белку, сохраняет способность формировать димеры и тримеры. Кроме того, была получена панель мышиных моноклональных AT, связывающих этот белок и перекрестно реагирующих с ВОВ, ВЭ и ВОК, некоторые из которых нейтрализовали инфекционность ВОВ и ВНО. Все эти данные позволяли рассматривать рекомбинантный белок ргA30L в качестве перспективного антигена для отбора антител, обладающих вируснейтрализующими свойствами.

Обогащение библиотеки клонами, продуцирующими scFv AT против белка ргА30L, проводили в ходе трех раундов биопэннинга, при этом для получения высокоаффинных AT на каждом последующем раунде биопэннинга уменьшали концентрацию рекомбинантного белка. Полученные после каждого раунда аффинной селекции поликлональные популяции фаговых антител, а также исходную фаговую библиотеку тестировали в ИФА на способность связываться с антигеном. Результаты тестирования (рис. 4) показали значительное увеличение сигнала при связывании антигенов фаговой популяцией, полученной после третьего раунда аффинной селекции, что свидетельствует об обогащении этой популяции клонами, продуцирующими специфические к белку ргА30L антитела.

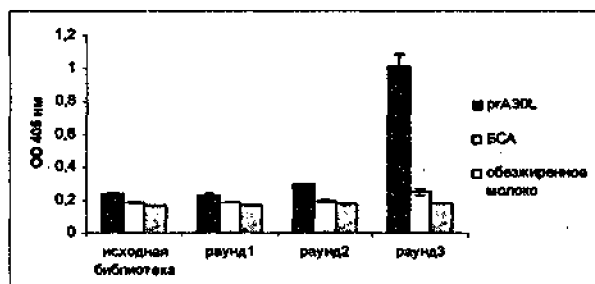


Рис. 4. Исследование связывания популяций фаговых антител с рекомбинантным белком ВНО ргА30L с помощью ИФА.

Была также протестирована вируснейтрализующая способность поликлональной популяции фаговых антител, полученной после аффинного обогащения комбинаторной иммунной библиотеки против белка ргА30L по сравнению с исходной библиотеккой. Результаты тестирования вируснейтрализующей активности последовательных разведений соответствующих популяции фаговых антител (рис. 5) показали, что после аффинного обогащения библиотеки против белка ргА30L, уровень антител способных нейтрализовать ВОВ в ней практически не изменился.

Из обогащенной фаговой популяции отбирали клоны, способные продуцировать AT, связывающиеся как с рекомбинантным белком ргА30L, так и с жизнеспособным ВОВ. Анализ связывания scFv AT, продуцируемых положительными клонами, проводили одновременно с обоими антигенами. Это позволяет преимущественно отбирать такие AT, которые связывают эпитопы рекомбинантного белка, присутствующие в его природном аналоге в составе вирионов. Задачей данного исследования был отбор из сконструированной библиотеки вируснейтрализующих антител, поэтому для дальнейшего анализа были взяты только те антитела, которые были способны связывать

жизнеспособные вирусные частицы, поскольку именно они могли обладать биологической активностью.

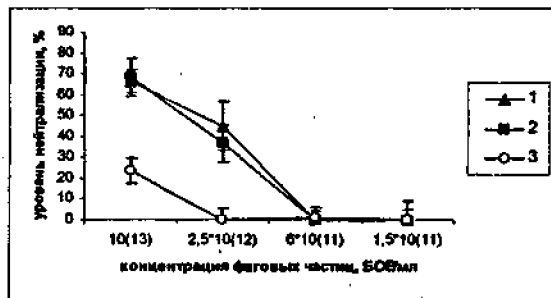


Рис. 5. Нейтрализация ВОВ популяцией фаговых антител, полученной после аффинного обогащения комбинаторной фаговой библиотеки против белка рgA30L (1), и исходной комбинаторной библиотекой (2) в культуре клеток *Vero* E6. 3 – контроль неспецифической нейтрализации ВОВ (anti-Thy антитело). Титр ВОВ – 250 БОЕ/мл.

В результате проведения скрининга клонов методом дот-анализа и ИФА и проведения ПДРФ-анализа scFv-генов было отобрано 20 уникальных АТ, связывающих как рА30L, так и ВОВ. Проверка способности отобранных против белка рА30L фаговых АТ нейтрализовать инфекционность ВОВ показала, что два из 20 АТ – 4.1 и d4 проявляли вируснейтрализующую активность (рис. 6). При тестировании способности последовательных разведений фаговых агител 4.1 и d4 нейтрализовать ВОВ, оказалось, что агитело 4.1 нейтрализовало инфекционность ВОВ при разведении до $2,5 \times 10^{11}$ БОЕ/мл, а агитело d4 – при разведении до 10^{12} БОЕ/мл.

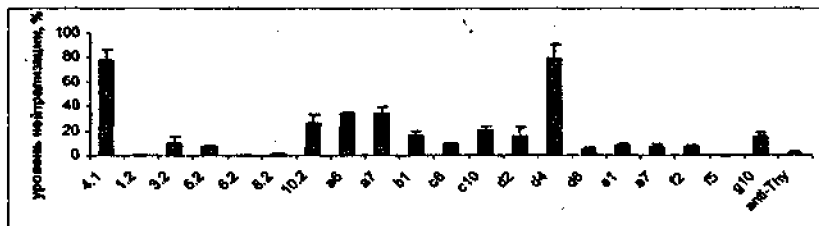


Рис. 6. Нейтрализация ВОВ фаговыми одноцепочечными анти-рA30L антителами в культуре клеток Vero Е6. Титр фаговых антител 10^{12} БОЕ/мл, титр ВОВ – 250 БОЕ/мл.

По результатам вестерн-блот анализа, вируснейтрализующие анти-rA30L антитела выявляли рекомбинантный белок rA30L, перенесенный на нитроцеллюлозную мембрану, в отличие от всех остальных антител, отобранных против этого белка (рис. 7). Исходя из этих данных, было сделано предположение, что вируснейтрализующие эпитоп или эпитопы rA30L, связываемые AT 4.1 и d4, являются линейными.

Связывание препаративно наработанных фаговых антител 4.1 и d4 с рgA30L и BOB исследовали с использованием ИФА. Было показано, что фаговые антитела 4.1 и d4 в разведении 4×10^9 БОЕ/мл достоверно выявляют BOB.

После определения нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих отобранные против рgA30L антитела, способные нейтрализовать BOB, и выведения из них аминокислотных последовательностей V_H и V_L доменов, оказалось что V_H домены этих антител относятся к 23 подсемейству V_H3 семейства иммуноглобулинов человека. CDR3-участки V_H доменов, в значительной степени определяющие специфичность, аффинность и вируснейтрализующие свойства антител, не имели гомологии между собой. V_L домены антител 4.1 и d4 принадлежат разным подсемействам V_L3 семейства и отличаются лишь по нескольким аминокислотным остаткам.

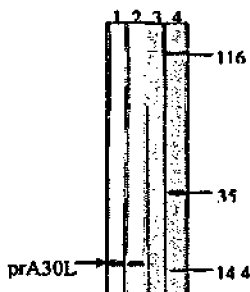


Рис. 7. Иммуноблоттинг белка рgA30L с фаговыми антителами 4.1 (1) и d4 (2) и anti-Thy антителом (3); 4 – маркер молекулярных масс белков.

Таким образом, из сконструированной комбинаторной библиотеки scFv AT человека были отобраны два уникальных антитела, 4.1 и d4, специфично связывающие рекомбинантный белок рgA30L и способные нейтрализовать BOB.

Отбор антител против ВОК

В качестве еще одного антигена для обогащения сконструированной библиотеки scFv AT человека был выбран вирус оспы коров (ВОК), штамм Гриппак. В настоящее время показано, что этот вирус наиболее близок к предшественнику рода ортопоксвирусов и является патогенным для многих животных, представляющих различные таксономические группы (Shchelkunov et al., 2005). У человека он вызывает заболевание, протекающее в местной форме, которое характеризуется развитием единичных поражений, чаще всего на кистях, предплечьях и лице; очень редко заболевание протекает в генерализованной форме. Для максимального сохранения всех возможных вирусных эпитопов был использован жизнеспособный вирус, так как

известно, что при инактивации разрушаются конформационные эпитопы вирусных белков. Используемый препарат ВОК был наработан на ХАО КЭ и очищен путем центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. При таком способе очистки вирусная популяция в основном представлена инфекционной формой IMV.

Для обогащения библиотеки клонами, продуцирующими scFv AT против ВОК, было подведено только два раунда биопаннинга, поскольку, как было показано ранее, дальнейшее обогащение привело бы к снижению разнообразия представленных в библиотеке анти-ВОК антител. К тому же, уже после второго раунда в библиотеке существенно увеличилось количество фагов, экспонирующих специфичные к ВОК антитела, как было показано с помощью ИФА (рис. 8).

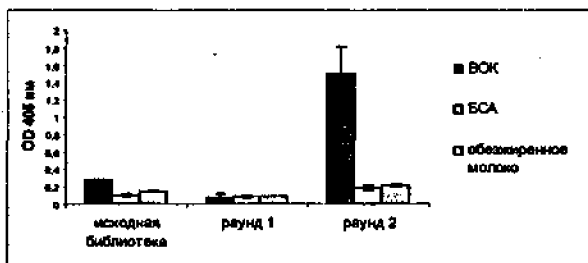


Рис. 8. Исследование связывания популяций фаговых антител с ВОК с помощью ИФА. Титр популяций фаговых AT – 10^{12} БОЕ/мл.

Способность фаговых популяций, полученных в ходе аффинного обогащения против ВОК, связывать различные белки ВОВ и ВОК была оценена с помощью Вестерн-блот анализа (рис. 9). Было показано, что после второго раунда аффинного обогащения против ВОК, в библиотеке одноцепочечных антител человека доминируют антитела, связывающие белок с молекулярной массой около 35 кДа.

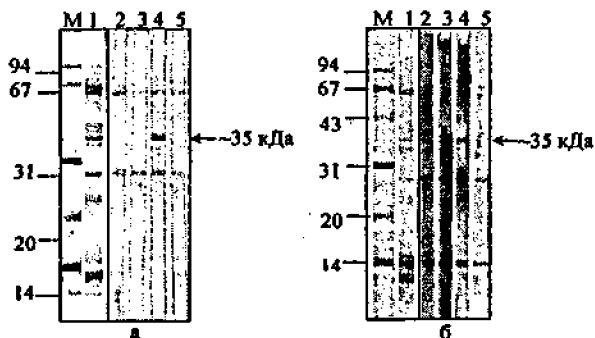


Рис. 9. Иммуноблоттинг белков ВОВ (а) и ВОК (б) с исходной популяцией фаговых антител (2) и популяциями фаговых антител, полученных после первого (3) и второго (4) раунда аффинного обогащения библиотеки против ВОК; и с anti-Thy антителом (5). М – маркер молекулярных масс белков, 1 – белковые профили соответствующих вирусов.

Была также протестирована вируснейтрализующая способность поликлональной популяции фаговых антител, полученной после аффинного обогащения комбинаторной иммунной библиотеки против ВОК по сравнению с исходной библиотекой. Результаты тестирования показали, что после аффинного обогащения библиотеки против ВОК уровень антител, способных нейтрализовать ВОК, в ней значительно возрастает (рис. 10).

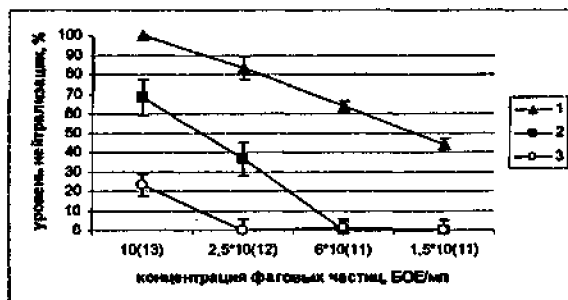


Рис. 10. Нейтрализация ВОК популяцией фаговых антител, полученной после аффинного обогащения комбинаторной фаговой библиотеки против ВОК (1), и исходной комбинаторной библиотекой (2) в культуре клеток *Vero E6*. 3 – контроль неспецифической нейтрализации ВОК (anti-Thy антитело). Титр ВОК 320 БОЕ/мл.

Из обогащенной против ВОК библиотеки было отобрано 15 клонов, способных продуцировать антитела, связывающиеся с ВОК, среди которых после проведения ПДРФ-анализа было выявлено 14 уникальных антител. Для некоторых рестрикционных профилей размеры рестрикционных фрагментов, предположительно соответствующие VN-генам, совпадали, что позволило выделить 3 группы антител (рис. 11):

- группа 1 – a4, b9, f11;
- группа 2 – c4, d2, e7, e8, h1;
- группа 3 – f9, g1.

У антител e10, f6, g4 и h6 размеры рестрикционных фрагментов, соответствующих VN-генам, существенно различались (рис. 11).



Рис. 11. Электрофоретический анализ ДНК, кодирующей анти-ВОК scFv AT, гидролизованной эндонуклеазой рестрикции *HaeIII*, в 6% ПААГ. М – *HaeIII*-гидролизат плазмиды pBR327.

Все отобранные фаговые антитела были протестированы на способность нейтрализовать ВОК в культуре клеток *Vero* Е6 (рис. 12). Среди анти-ВОК антител вируснейтрализующими оказались 10 антител: а4, b9, f11, с4, d2, е7, е8, h1, g4 и f6, причем выраженную вируснейтрализующую способность (уровень нейтрализации > 80%) показали 8 из них.

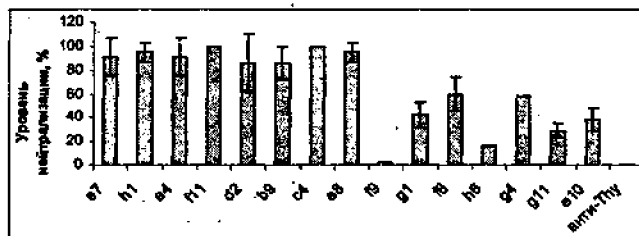


Рис. 12. Нейтрализация ВОК фаговыми одноцепочечными анти-ВОК антителами в культуре клеток *Vero* Е6. Титр фаговых антител – 10^{13} БОЕ/мл, титр ВОК – 320 БОЕ/мл.

Поскольку уровень нейтрализации для антител, объединенных в группы 1 и 2 по результатам ПДРФ-анализа, различался незначительно, анализ способности нейтрализовать бляшкообразование ВОК и ВОВ последовательных разведений антител, был проведен только для одного антитела из каждой группы (для b9 из группы 1 и для d2 из группы 2). Фаговое антитело b9 нейтрализовало инфекционность ВОВ и ВОК при разведении до $3,5 \times 10^{12}$ БОЕ/мл, а фаговое антитело d2 – инфекционность ВОК при разведении до $8,9 \times 10^{11}$ БОЕ/мл, а инфекционность ВОВ при разведении до $3,5 \times 10^{12}$ БОЕ/мл (таблица 1).

В качестве положительного контроля нейтрализации было взято МАТ 2D5, отобранное против ортопоксвирусов [Ichihashi et al., 1996]. Было оценено количество АТ, необходимых для нейтрализации инфекционности одного вириона. С учетом того, что физический титр ортопоксвирусов, используемых для нейтрализации в 100-1000 раз больше, чем инфекционный, на один вирион приходится 10^5 - 10^6 молекул МАТ 2D5. Таким образом, поскольку для нейтрализации ортопоксвирусов недостаточно одной молекулы МАТ на вирион, можно предположить, что механизм нейтрализации является многоударным. При оценке количества фаговых антител мы учитывали литературные данные о том, что только 10% фаговых АТ экспонируют scFv АТ на своей поверхности, и при этом большинство фаговых антител содержит только одну копию scFv АТ. Оказалось, что для нейтрализации инфекционности одного вириона необходимо 10^6 - 10^7 фаговых антител, что только на порядок больше, чем необходимое количество МАТ 2D5. При этом фаговые антитела содержат только один антигенсвязывающий центр, в то время как МАТ – два.

По результатам вестерн-блот анализа вируснейтрализующие анти-ВОК антитела а4, b9, f11, с4, d2, е7, е8 и h1 связывали белок ВОК массой около 35 кДа, а остальные, включая вируснейтрализующие антитела f6 и g4, — не выявляли какого-либо белка, и, по-видимому, связывали конформационные эпитопы вирусных белков (рис. 13). Исходя из этих данных, было сделано предположение, что вируснейтрализующие эпитопы (или эпитоп) вирусного белка массой около 35 кДа, связываемого антителами а4, b9, f11, с4, d2, е7, е8, е9 и h1, являются линейными.

Таблица 1. Характеристика вируснейтрализующей способности фаговых антител, классификация кодирующих их V-генов и сравнение третьих гипервариабельных участков их V_H доменов.

AT	Нейтрализация		Семейства V-генов		VH CDR3
	+/-	Титр, БОЕ/мл	VH	VL	
a4	+	н.о.	3-9	κ1 O12	DRIAARR-GAFDI
b9	+	3.5×10^{12} для ВОК и BOB	3-9	κ1 L12	ERIAAPR-GAFDL
f11	+	н.о.	3-9	κ1 O18	DRIAVAR-GAFDH
c4	+	н.о.	3-9	κ1 L12	GSIAALRNHAFDI
d2	+	1.56×10^{12} для ВОК 6.25×10^{10} для BOB	3-9	κ1 O12	GSIAALRNHAFDI
e7	+	н.о.	3-9	κ1 O12	GSIAALRNHAFDI
e8	+	н.о.	3-9	κ1 O12	GSIAALRNHAFDI
h1	+	н.о.	3-9	κ1 O12	GSIAALRNHAFDI
f6	+	н.о.	1-18	λ1 16	DGLGK---NGFDI
g1	-	н.о.	3-11	λ2 13	KFLGG-LVLISLI
h6	-	н.о.	3-11	λ2 16	SFRRLGTNKSNI--
e10	-	н.о.	1-46	κ1 O18	RG-----FDY
f9	-	н.о.	1-2	κ1 L12	EPRVIAVAGYFDY
g4	+	н.о.	1-18	κ1 O12	GPGYCG-GDCFDY

* Семейства V-генов определены с помощью базы данных V-base.

С целью исследования кросс-реактивности вируснейтрализующих анти-ВОК антител, был проведен вестерн-блот анализ белков BOB и ВЭ с фаговыми анти-ВОК антителами. Было показано, что вируснейтрализующие антитела а4, b9, f11, с4, d2, е7, е8 и h1 связывали также белки BOB и ВЭ массой около 35 кДа. Также было проанализировано связывание последовательных разведений всех отобранных против ВОК фаговых антител с ВОК, BOB и ВЭ (Таблица 2). Оказалось, что все отобранные фаговые антитела оказались способными связывать эти ортопоксвирусы.

Так же, как и V_H домены вируснейтрализующих анти-prA30L антител, V_H домены анти-ВОК антител, продемонстрировавших выраженную нейтрализующую активность, относятся к V_H3 семейству. При этом анализ аминокислотных последовательностей этих антител, также, как и ПДРФ-анализ, позволил выделять среди отобранных антител группы антител со сходными последовательностями V_H доменов: группу 1 — а4, b9 и f11;

и группу 2 – с4, d2, e7, e8 и h1. При этом CDR3-участки V_H доменов антител второй группы имеют одинаковую последовательность GSIAALRNHAFDI, а CDR3-участки V_H доменов антител первой группы различаются по нескольким аминокислотам, но в них

Таблица 2. Характеристики связывания антител с различными ортопоксвирусами.

АТ	Титр фаговых антител в ИФА, БОЕ/мл*		
	ВОК	ВОВ	ВЭ
a4	1.6×10^4	1.6×10^4	1.6×10^4
b9	8×10^3	8×10^3	8×10^3
f11	1.6×10^4	1.6×10^4	1.6×10^4
c4	3.2×10^7	1.6×10^4	1.6×10^4
d2	3.2×10^7	1.6×10^4	1.6×10^4
e7	3.2×10^7	1.6×10^4	1.6×10^4
e8	1.6×10^4	8×10^3	8×10^3
h1	1.6×10^4	8×10^3	8×10^3
f6	10^{11}	10^{11}	10^{11}
g1	10^{11}	2×10^{10}	2×10^{10}
h6	10^{11}	4×10^9	4×10^9

*Титр фаговых антител, при котором положительный сигнал в ИФА выше отрицательного контроля в 2 раза. Вирус сорбирован в концентрации 2 мкг/мл.

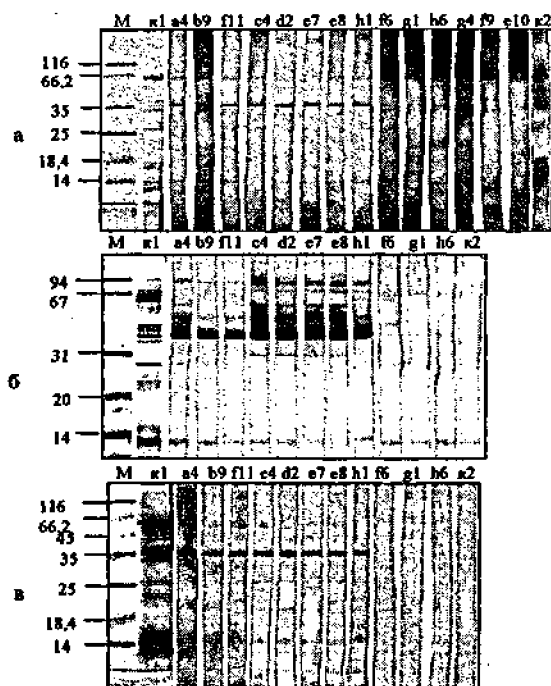


Рис. 13. Иммуноблоттинг белков ВОК (А), ВОВ (Б) и вируса экстремелии (В) с фаговыми анти-ВОК антителами и anti-Thy антителом (κ2). М – маркер молекулярных масс белков, κ1 – белковые профили соответствующих вирусов.

можно выделить мотив DRIAARRGAFTI (выделен жирным шрифтом и подчеркнут), присутствующий и в CDR3 V_H доменов антител второй группы. Интересно, что в последовательности CDR3 V_H домена антитела f6, показавшего менее выраженную вируснейтрализующую активность (уровень нейтрализации около 60%), можно выделить аминокислоты, содержащиеся в том же положении в CDR3 V_H доменов антител второй группы DG██GKNG███ (выделены серым), хотя V_H домен этого антитела принадлежал V_H1 семейству.

Оценка аффинности отобранных вируснейтрализующих scFv антител.

При работе с фаговыми антителами концентрацию scFv AT можно оценить лишь приблизительно, с учетом литературных данных о том, что из пяти копий белка pIII, только одна является гибридным белком, содержащим вставку scFv, а фаговых частиц, содержащих такой гибридный белок только 10% от всей фаговой популяции. Основываясь на этих данных невозможно определить константу аффинности того или иного scFv AT. Поэтому с целью оценки аффинности полученных scFv AT необходимо переводить их в растворимую форму, то есть получать их в виде отдельных, не связанных с бактериофагом молекул, не содержащих фрагмента оболочечного белка бактериофага.

В данной работе для оценки константы аффинности были выбраны 2 антитела, обладающие выраженной нейтрализующей активностью, входящие в состав 1 и 2 групп, выделенных по данным ПДРФ-анализа и скринингования. Для этого клетки *E. coli* несупрессорного штамма HB2151, транслирующие TAG как стоп-кодон, находящийся в структуре антитела перед белком pIII бактериофага (рис. 3), были трансформированы фагмидными ДНК pHEN-b9 и pHEN-d2. После наработки и очистки рекомбинантных белков оказалось, что способность связывать ВОК сохранило только scFv AT b9.

Некоторые авторы полагают, что уровень наработки растворимых scFv AT с правильной конформацией зависит в основном от аминокислотной последовательности, входящих в их состав переменных доменов. На основании этого было сделано предположение, что сохранить функциональность молекулы scFv AT b9 позволила его повышенная гидрофильность, поэтому был проведен сравнительный анализ аминокислотного состава scFv AT b9 и d2. Оказалось, что относительное количество гидрофобных остатков в молекуле scFv AT d2 было большим по сравнению с таковым в молекуле scFv AT b9, что, по-видимому, могло привести к неправильному фолдингу молекулы одноцепочечного антитела и, как следствие, к потере его функциональности.

После измерения концентрации белка и проведения ИФА при последовательном титровании одноцепочечного антитела с помощью программы «Origin 7.0» была рассчитана константа аффинности одноцепочечного антитела sb9, которая составила $K_{aff} = 3,13 \pm 0,52 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (рис. 14). Как уже упоминалось ранее, по литературным данным, размер сконструированной в данной работе библиотеки позволяет получать фрагменты антител с константами аффинности от 5×10^3 до $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$.

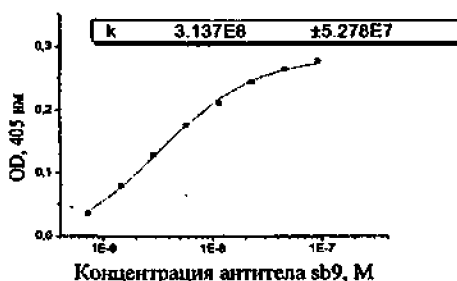


Рис. 14. Определение константы аффинности одноцепочечного антитела sb9 с использованием непрямого иммуферментного анализа.

Поскольку выбранная для конструирования библиотеки фагмидная векторная система приводит к моновалентному дисплею scFv AT на поверхности фаговой частицы, в результате аффинного обогащения в библиотеке преобладают бактериофаги, экспонирующие на своей поверхности высоко аффинные антитела. Как и ожидалось, константа аффинности одного из отобранных scFv AT sb9 превысила это значение. Поскольку по результатам вестерн-блот анализа, фаговое антитело b9, как и большинство антител, отобранных из обогащенной против ВОК комбинаторной фаговой библиотеки, было специфично к белку массой около 35 кДа, было сделано предположение о том, что вирусный белок массой около 35 кДа является основной мишенью для вируснейтрализующих антител, аффинность которых увеличивается при развитии иммунного ответа после вакцинации ВОВ.

Определение белка мишени для вируснейтрализующих анти-ВОК scFv AT

В данной работе методом вестерн-блот анализа было показано, что в результате аффинного обогащения против ВОК, в комбинаторной иммунной библиотеке преобладают scFv AT, специфичные к белку ВОК и ВОВ массой 35 кДа, и большинство вируснейтрализующих анти-ВОК scFv AT выявляло этот же белок. Среди иммунодоминантных белков ортопоксвирусов, белки, обладающие молекулярными массами около 35 кДа, закодированы в OPT D8L и H3L (BOB, Копенгаген). Нами было

сделано предположение, что белок с которым связывается основная масса антител, отобранных из сконструированной библиотеки, возможно, является белок, закодированный в OPT J3L BOB или J3L BOK.

Для проверки этого предположения в данной работе впервые был получен штамм-продуцент рекомбинантного белка BOK рJ3L, являющегося аналогом белка р35 BOB. Праймеры для амплификации гена, кодирующего белок BOK J3L, были подобраны таким образом, чтобы амплифицируемый фрагмент гена не содержал части, кодирующей трансмембранный домен белка, по всей видимости, не содержащих антигенных детерминант, экспонированных на поверхности вирусной частицы.

В качестве экспрессирующего вектора был взята плазмида pUR291, содержащая ген, кодирующий β-галактозидазу, в составе которого был клонирован фрагмент ДНК, кодирующий часть белка J3L (рис. 15). При использовании такого метода наработки рекомбинантного белка 5'-концевая область мРНК прокариотического гена сохраняется нативной, и поэтому оптимальна для инициации трансляции. Кроме того, гибридный белок в меньшей степени, чем «чистый», подвергается протеолитической деградации. Гибридные белки, полученные таким образом, как правило, сохраняют ферментативную активность и антигенные свойства, характерные для продуктов бактериального гена, входящего в состав гибридного белка, что существенно упрощает процедуру их очистки и выделения.

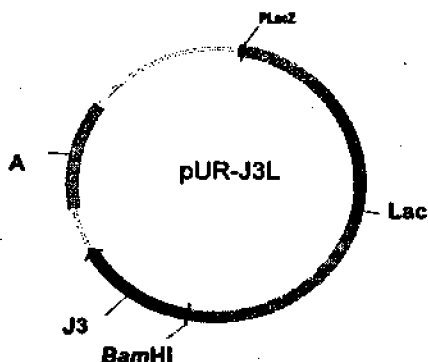


Рис. 15. Схема плазмиды pUR-J3L, содержащей ген J3L, кодирующий р35 белок BOK. Указаны сайты для эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI; промотор лактозного оперона P *lac*Z; ген *Lac*Z, кодирующий β-галактозидазу *E.coli*; *Ap^r*- ген устойчивости к ампициллину.

После встраивания фрагмента гена, кодирующего белок J3L ВОК, в плазмиду pUR291, клетки *E. coli* DH5αF⁻, содержащие результирующую плазмиду pUR-J3L, культивировали в присутствии индуктора Лас промотора ИППТ. Уровень продукции гибридного белка в этих клетках был оценен с помощью электрофоретического анализа клеточного лизата в 10% ПААГ и составил около 15 % от суммарного клеточного белка. Для подтверждения того, что в составе гибридного рекомбинантного белка сохранились эпитопы, присутствующие в его природном аналоге в составе вирионов, с помощью вестерн-блот анализа было показано, что антитела из сывороток ревакцинированных ВОВ людей связывали рекомбинантный белок ргJ3L.

Для подтверждения того, что белком-мишенью вируснейтрализующих фаговых антител, отобранных против ВОК, является иммунодоминантный белок р35 ортопоксвирусов, с помощью вестерн-блот анализа была исследована их способность связывать рекомбинантный белок ргJ3L. Оказалось, что фаговые антитела а4, b9, f11, c4, d2, e7, e8, e9 и h1 выявляли рекомбинантный белок ргJ3L (рис. 16).

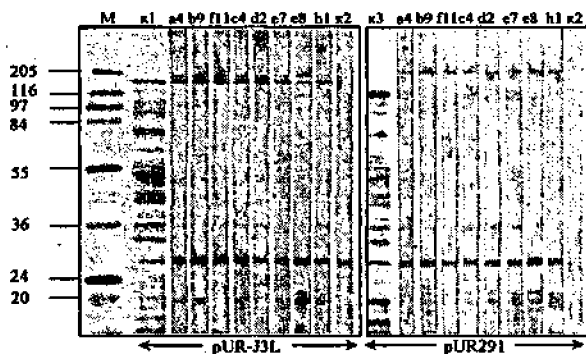


Рис. 16. Иммуноблоттинг белков клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой pUR-J3L (x1), и клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой pUR291 (x3), с фаговыми анти-ВОК антителами и anti-Thy антителом (x2). М – маркер молекулярных масс белков.

Кроме того, было показано, что после двух раундов биоинзингирования комбинаторной библиотеки scFv AT человека против ВОК, в обогащенной фаговой популяции доминируют антитела, связывающие рекомбинантный белок ргJ3L (рис. 17). Поскольку эта же фаговая популяция выявляет белок ВОК, ВОВ и ВЭ, массой около 35 кДа (рис. 9), был сделан вывод, что после аффинного обогащения против жизнеспособного ВОК, в библиотеке преобладают антитела, связывающие белок, закодированный OPT J3L ВОК, и перекрестно реагирующие с белками р35 ВОВ и ВЭ. Следовательно, можно сделать вывод, что в ходе иммунного ответа на ВОВ, одним из основных иммунодоминантных белков, против которого нарабатывается основная масса вируснейтрализующих антител, является белок р35, закодированный OPT H3L.

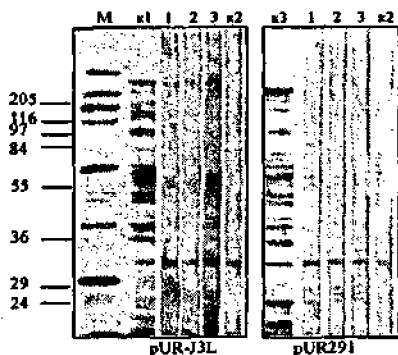


Рис. 17. Иммуноблоттинг белков клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой pUR-J3L (к1), и клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой pUR291 (к3), с исходной популяцией фаговых антител (1), с популяциями фаговых антител, полученных после первого (2) и второго (3) раунда аффинного обогащения библиотек против ВОК; и с anti-Thy антителом (к2). М – маркер молекулярных масс белков.

Таким образом, в ходе проделанной работы впервые была сконструирована комбинаторная иммунная библиотека одноцепочечных антител человека против ортопоксвирусов размером 3×10^7 независимых клонов. Было показано, что более 97% клонов сконструированной библиотеки содержат гены, кодирующие одноцепочечные антитела человека, которые могут быть наработаны в виде индивидуальных молекул без оболочечного белка бактериофага.

Сконструированная библиотека была обогащена против двух различных по своей природе антигенов: рекомбинантного белка ВНО ргA30L и жизнеспособного ВОК. Из обогащенной против рекомбинантного белка библиотеки были отобраны два вируснейтрализующих фаговых АТ, специфичных к рекомбинантному белку ВНО ргA30L. Из обогащенной против ВОК библиотеки было отобрано 10 фаговых антител, способных нейтрализовать ВОК. С целью определения белка-мишени для вируснейтрализующих антител был получен штамм *E. coli*, продуцирующий рекомбинантный белок ргJ3L ВОК (штамм Гришак). Оказалось, что из 10 вируснейтрализующих антител, 8 выявляли рекомбинантный белок методом вестерн-блот анализа. Эти же антитела выявляли вирусные аналоги ргJ3L белка – р35 белок ВОК, ВОВ и ВЭ при проведении вестерн-блот анализа белковых профилей соответствующих вирусов. Было также показано, что после обогащения против жизнеспособного ВОК, в комбинаторной иммунной библиотеке преобладают антитела, связывающие р35 белок ВОК и ВОВ, что являлось подтверждением иммунодоминантных свойств р35 белка ВОВ при развитии иммунного ответа у человека после вакцинации.

ВЫВОДЫ

1. Впервые сконструирована иммунная комбинаторная библиотека одноцепочечных антител человека против ортопоксвирусов. Размер библиотеки составил 3×10^7 независимых клонов, функциональный размер – не менее 97%.
2. Получен штамм *Escherichia coli*, продуцирующий рекомбинантный белок ргJ3L вируса оспы коров (штамм Гриппак) с уровнем продукции около 15% суммарного клеточного белка.
3. Из сконструированной библиотеки методом аффинной селекции было отобрано 20 уникальных одноцепочечных антител человека, специфичных к рекомбинантному белку вируса натуральной оспы ргA30L. Было показано, что антитела 4.1 и d4 способны нейтрализовать инфекционность вируса осповакцины.
4. Методом аффинной селекции из сконструированной библиотеки было отобрано 14 уникальных одноцепочечных антител человека, специфичных к вирусу оспы коров. Показано, что 10 из отобранных антител способны нейтрализовать инфекционность вируса оспы коров. Показано, что 8 из 10 вируснейтрализующих антител специфически взаимодействуют с рекомбинантным белком ргJ3L, а также с его природными аналогами в составе вирионов вирусов оспы коров, осповакцины и экстремелии.
5. Определены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих вируснейтрализующие антитела и показано, что:
 - V_H домены антител 4.1 и d4 принадлежат к 23 подсемейству V_{H3} семейства иммуноглобулинов человека, а их V_L домены - к A30 и L19 подсемействам V_{K3} семейства иммуноглобулинов человека;
 - V_H домены антител, отобранных против ВОК, принадлежат к 9 подсемейству V_{H3} семейства и к 18 подсемейству V_{H1} семейства иммуноглобулинов человека, а их V_L домены - к O12, O18 и L12 подсемействам V_{K1} семейства и к 16 подсемейству V_{L1} семейства иммуноглобулинов человека.
6. Впервые получен штамм *Escherichia coli*, продуцирующий в растворимой форме одноцепочечное антитело b9, отобранное против вируса оспы коров. Определена константа аффинности одноцепочечного антитела b9 в реакции связывания с вирусом оспы коров, которая составила $3,1 \times 10^8 \pm 0,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

Основные результаты опубликованы в следующих работах:

1. В. В. Морозова, Н. В. Тикунова, Т. А. Батанова, Т. Э. Юн, Е. И. Бовшик, Е. В. Жираковская, В. В. Воронина (Дубровская), Д. И. Бобко, Е. Ф. Беланов, А. А. Ильичев, Л. С. Садахчиев. Мини-антитела человека против ортопоксвирусов. // Вестник РАМН.-2004.-№8.-С. 22-27.
2. В. В. Дубровская, Н. В. Тикунова, В. В. Морозова, Н. И. Бормотов, А. Г. Ламан, А. Б. Улитин, Ф. А. Бровко, Е. Ф. Беланов, А. А. Ильичев Комбинаторная фаговая библиотека одноцепочечных антител человека, обогащенная антителами против вируса осповакцины, рекомбинантная фагмидная ДНК рНЕН-3А10, содержащая уникальный ген одноцепочечного антитела человека, способного нейтрализовать ортопоксвирусы, и искусственное одноцепочечное антитело человека 3А10, способное нейтрализовать ортопоксвирусы// Заявка на патент РФ. Справка о приоритете № 2005125994 от 15.08.05.
3. Т. А. Батанова, А. Б. Улитин, В. В. Морозова, А. Г. Ламан, Е. В. Жираковская, В. В. Дубровская, Ф. А. Бровко, Н. В. Тикунова Создание и характеристика плавной комбинаторной библиотеки одноцепочечных антител человека. Мол. ген. вирусол. и микробиол. 2006. №3, с. 35-41.
4. В. В. Дубровская, Н. В. Тикунова Получение одноцепочечных антител человека к основному иммунодоминантному белку ортопоксвирусов. Вестник НГУ.-2006.-Том 4.-выпуск 4.-С. 100-105.
5. V. V. Voronina (Dubrovskaya), E. F. Belanov, N. V. Tikunova Phage display immune library of human scFv against orthopoxviruses. 18th International conference on antiviral research. Barcelona, Spain. 2005. Antiviral research, 2005 - V.65. p. 83.
6. V. V. Voronina (Dubrovskaya), A. B. Uitin, A. G. Laman, F. A. Brovko, A. A. Ilyichev N. V. Tikunova Human scFvs to orthopoxviruses from phage display immune library. 7th John Humphrey advanced summer programme in immunologythe interface between immunology and medicine. 2005. с. 61.
7. V. V. Morozova, V. V. Voronina (Dubrovskaya), M. V. Shveigert, E. F. Belanov, A. A. Ilyichev, N. V. Tikunova Group-specific and neutralizing human scFv to Orthopoxviruses from a combinatorial phage library. 18th International conference on antiviral research. Barcelona, Spain. 2005. Antiviral research, 2005 - V.65. p. 83.
8. Н. В. Тикунова, Л. Э. Матвеев, В. В. Морозова, В. В. Дубровская, Т. А. Батанова, Т. Э. Юн, Н. И. Бормотов, Е. Ф. Беланов, Л. Н. Шингарова, А. А. Ильичев, Л. С. Садахчиев Дизайн рекомбинантных антител. Международная конференция

«Физико-химическая биология» 30 июля – 3 августа 2006, Новосибирск, Россия, с. 67.

9. N. Tikunova, V. Dubrovskaya, V. Morozova, T. Yun, T. Batanova, M. Schweigert, N. Bormotov, E. Belanov, M. Philipenko, L. Shingarova, S. Sennikov Development of therapeutic antibodies. International conference "Basic Science for Biotechnology and Medicine" September 3-7, 2006, Novosibirsk, Russia, p. 30.
10. В. В. Дубровская, А. Е. Улитин, А. Г. Ламан, В. В. Морозова, Н. И. Бормотов, А. А. Ильичев, Ф. А. Бровко, Е. Ф. Беланов, Н. В. Тикунова. Отбор вируснейтрализующих одноцепочечных антител человека к иммунодоминантному белку N3L ортопоксвирусов из комбинаторной иммунной библиотеки. III Российская научная конференция с международным участием «Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера. Новосибирск, Россия, 27-29 сентября 2006. с. 173.
11. Н. В. Тикунова, В. В. Дубровская, В. В. Морозова, Т. Э. Юн, Н. И. Бормотов, Е. Ф. Беланов, А. А. Ильичев, Л. С. Сандахчиев Разработка искусственных антител человека против ортопоксвирусов. VII Межгосударственная научно-практическая конференция. Оболенск, Россия, 3-5 октября 2006. с.162.
12. Результаты исследований были доложены на ежегодных Meeting of the WHO Advisory Committee on Variola Virus Research (Женева, Швейцария, 2004, 2005, 2006).



Дубровская Виктория Владиславовна

КОНСТРУИРОВАНИЕ ИММУННОЙ КОМБИНАТОРНОЙ БИБЛИОТЕКИ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА И ОТБОР ИЗ НЕЕ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ОРТОПОКСВИРУСОВ

Автореф. дисс. на соискание учёной степени кандидата биологических наук.

Подписано в печать 16.11.2006. Заказ № 127.

Формат 60х90/16. Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.

Типография Института катализа им. Г.К. Борескова СО РАН

