

Морозова Вера Витальевна

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ
РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА
ПРОТИВ ОРТОПОКСВИРУСОВ**

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2005

Работа выполнена в ФГУП Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» МЗСР РФ.

Научный руководитель

кандидат биологических наук Тикунова Н.В.

Официальные оппоненты

доктор биологических наук Рябчикова Е.И.

доктор биологических наук Гуляева Л.Ф.

Ведущая организация

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО
РАН, Новосибирск

Защита состоится « 29 » декабря 2005 года в 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д.208.020.01 при ФГУП Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» МЗ РФ по адресу: ФГУП ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово Новосибирской области, 630559, тел.(383)336-74-28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП ГНЦ ВБ «Вектор».

Автореферат разослан « 28 » ноября 2005 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета



Малыгин Э.Г

2006-4
29968

2 264036

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

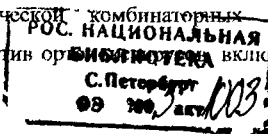
Актуальность проблемы. Род Orthopoxvirus состоит из сложных ДНК-содержащих вирусов, реплицирующихся в цитоплазме клеток позвоночных. Для человека на протяжении всей его истории наиболее важным из ортопоксвирусов был вирус натуральной оспы, который более двух тысяч лет являлся причиной эпидемий опасного генерализованного заболевания. Естественная трансмиссия натуральной оспы была прервана в 1977 году, менее чем через два столетия после начала применения профилактических прививок вирусом оспы коров и вирусом осповакцины. Возобновление интереса к ортопоксвирусам у исследователей можно объяснить распространением оспы обезьян в Африке и других странах, а также сохраняющейся возможностью использования вируса натуральной оспы для биотерроризма.

В настоящее время в мире имеется только две официальные коллекции вируса натуральной оспы, одна из которых находится в ГНЦ ВБ «Вектор». Поэтому по рекомендации ВОЗ в нашей стране была разработана Программа комплексных исследований вируса натуральной оспы, включающая фундаментальные исследования ортопоксвирусов и получение иммунобиологических препаратов. Данная работа выполнялась в рамках этой программы.

Большая часть информации о гуморальном иммунитете к ортопоксвирусам получена при изучении моноклональных антител грызунов против ортопоксвирусов, исключая вирус натуральной оспы, а имеющиеся данные о молекулярных механизмах патогенеза вируса натуральной оспы получены на модельных инфекциях лабораторных животных. Поэтому панели человеческих антител, специфических к ортопоксвирусам, включая вирус натуральной оспы, кроме их несомненной ценности в качестве источника для разработки иммунопрофилактических и иммунотерапевтических средств, могут быть полезны как инструмент для изучения особенностей иммунологического профиля ортопоксвирусов и молекулярных основ их вирулентности, а также для исследований особенностей иммунного ответа человека.

Целью данной работы являлось получение методами фагового дисплея однопечочных антител человека против ортопоксвирусов, включая вирус натуральной оспы, поиск группоспецифических или, в случае антител против вируса натуральной оспы, штаммо-специфических антител и отбор антител, обладающих вируснейтрализующими свойствами. Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи.

отобрать из иммунной и синтетической комбинаторных библиотек однопечочные антитела человека против ортопоксвирусов, включая вирус



натуральной оспы, штамм Butler;

- определить аминокислотные последовательности полученных одноцепочечных антител;
- исследовать отобранные антитела в реакции кросс-реактивного связывания с различными ортопоксвирусами;
- исследовать связывание отобранных антител с различными штаммами вируса натуральной оспы,
- провести поиск вируснейтрализующих антител в полученной коллекции.

Научная новизна и практическая ценность работы. В настоящей работе впервые получены одноцепочечные антитела человека против вируса натуральной оспы, штамм Butler, против вируса осповакцины и вируса экстремелии. Определены аминокислотные последовательности полученных антител. Исследовано связывание антител с различными ортопоксвирусами, выявлены группоспецифические антитела. Проведенные исследования способности отобранных антител к кросс-реактивному связыванию позволили высказать предположение о вкладе в иммунологические профили ортопоксвирусов эпитопов, конформации которых могут различаться у различных ортопоксвирусов.

Впервые исследовано связывание антител с различными штаммами вируса натуральной оспы. Впервые обнаружены антитела, обеспечивающие различное связывание штаммов вируса натуральной оспы, обладающих разной вирулентностью (*variola major* и *variola alastrim*).

В ходе данной работы впервые были отобраны одноцепочечные антитела человека, способные подавлять инфекционность вирусов осповакцины, оспы коров и экстремелии. На основе данных антител 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 для предупреждения поствакцинальных осложнений и, возможно, лечения ортопоксвирусных инфекций.

Апробация работы и публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи, получено положительное решение о выдаче авторского свидетельства. Материалы диссертации были представлены на 11 Международных конференциях: 5th John Humphrey Advanced Summer Programme in Immunology (Пушкино, Россия, 2000), “Human antibodies and hybridomas” (Праз, Чехия, 2001; Берн, Швейцария, 2002), 15-ой Международной конференции «Antiviral research» (Прага, Чехия, 2002), на XIII Международном вирусологическом конгрессе (Париж, 2002), Научной конференции «Проблемы

инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера» (Новосибирск, 2002); Международной научно-практической школе-конференции «Цитокины. Воспаление. Иммунитет». (Санкт-Петербург, Россия, 2002); 6th John Humphrey Advanced Summer Programme in Immunology, (Щуццо, Россия, 2002), 16-ой Международной конференции «Antiviral research» (Саванна, США, 2003), 17-ой Международной конференции «Antiviral research» (Туксон, США, 2004), 18-ой Международной конференции «Antiviral research» (Барселона, Испания, 2005)

Вклад автора. В исследованиях, проводимых с использованием жизнеспособного вируса натуральной оспы в условиях специальной лаборатории с уровнем защиты BSL 3-4, вместе с автором участвовали А.А.Гуськов, Е.Б.Сокунова, Т.Э.Юн, Е.В.Жираковская, Г.И.Бовшик, к.б.н. Н.В.Гукунова. Тестирование антигел на наличие вируснейтрализующей активности проводилось в лаборатории общих вирусов, руководитель к.м.н. Е.Ф.Беланов, в тестировании антител принимали участие вместе с автором Н.И.Бормотов и З.Ф.Киселева. Все остальные эксперименты и анализ полученных данных сделаны лично автором

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста, включая 27 рисунков и 6 таблиц и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы (202 наименования)

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

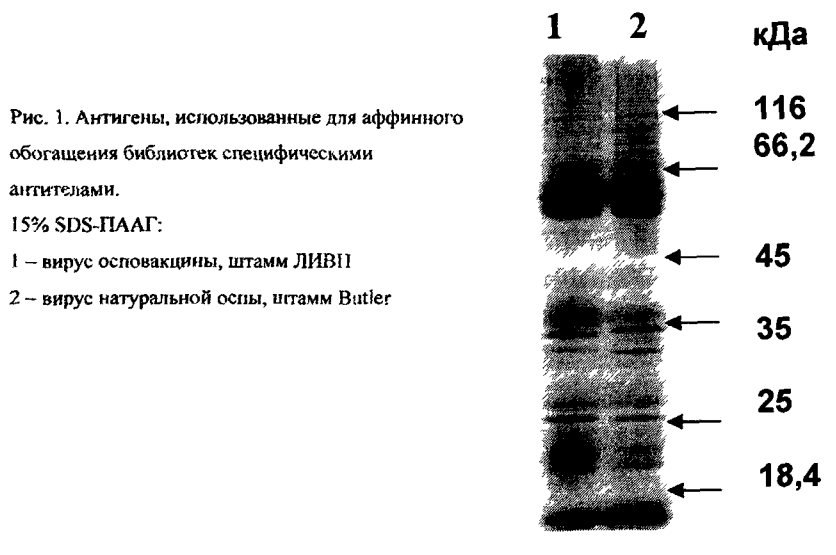
В данной работе использовали иммунную и синтетическую библиотеки одноцепочечных антител человека. Такой выбор был обусловлен тем, что из синтетических библиотек можно получить более широкий спектр антител против определенного антигена, а из иммунных библиотек, как правило, собирают узкий репертуар специфических антител, но полученные антитела чаще обладают биологической активностью

Иммунная библиотека одноцепочечных антител была сконструирована в лаборатории рекомбинантных белков ГИИЦ ВБ «Вектор» на основе мРНК периферических лимфоцитов крови 4 доноров, предварительно вакцинированных вирусом осповакцины. Синтетическая библиотека одноцепочечных антител человека Griffn1 была любезно предоставлена Medical Research Center (Кембридж, Англия)

Процесс получения специфических антител из комбинаторной библиотеки включал несколько последовательных раундов аффинного обогащения (биопanningа) исходной

библиотеки клонами, продуцирующими специфические антитела, с последующим отбором из обогащенных популяций уникальных антител, направленных против целевого антигена.

В качестве антигенов для аффинного обогащения использовали следующие ортопоксвирусы (рис. 1): вирус осповакцины, штамм ЛИБП, и вирус натуральной оспы,



штамм Butler, относящийся к группе alastrim штаммов минорной оспы. Для максимального сохранения антигенных профилей ортопоксвирусов в работе использовали жизнеспособные вирусы, так как известно, что инактивация, как правило, разрушает конформационные эпитопы вирусных белков. Все эксперименты со штаммами вируса натуральной оспы, то есть аффинное обогащение библиотеки, отбор и исследование отобранных фаговых антител, проводили в специальной лаборатории со степенью защиты BSL 3-4, сертифицированной ВОЗ и Министерством здравоохранения РФ.

В ходе экспериментов было независимо проведено аффинное обогащение синтетической библиотеки клонами, продуцирующими антитела против вируса осповакцины, и клонами, продуцирующими антитела против вируса натуральной оспы (рис. 2). Иммунная библиотека была обогащена клонами, продуцирующими антитела против вируса осповакцины (рис. 2).

Для того, чтобы избежать отбора антител на содержащиеся в вирусных препаратах белки тканевого или клеточного происхождения, в ходе аффинной селекции



Натуральная иммунная

библиотека одноцепочечных антител человека

(Лаборатория рекомбинантных белков, ФГУП ГНЦ ВБ «Вектор»)



Синтетическая библиотека

одноцепочечных антител человека
(MRC, Кэмбридж, Англия)



Рис. 2. Аффинное обогащение иммунной и синтетической библиотек клонами, специфическими к вирусу осповакцины и вирусу натуральной оспы.

использовали вирусы, наработанные на различных объектах. Так, аффинное обогащение библиотек антителами, специфическими к вирусу осповакцины, велось с использованием вируса, полученного в результате пассажей на коже телят, а отбор клонов осуществлялся против вирусов осповакцины и экстремелии, наработанных на ХАО РКЭ. При аффинной селекции антител против вируса натуральной оспы в первом и втором раундах обогащения был использован вирус, очищенный из ХАО РКЭ, а третий раунд обогащения проводился против вируса, наработанного на культуре клеток Vero E6. В этом случае отбор клонов осуществляли против ВНО, очищенного из ХАО РКЭ.

Надо отметить, что использованный нами способ очистки ортопоксвирусных препаратов позволяет получить хорошо очищенную популяцию зрелых внутриклеточных вирионов (IMV), что подтверждалось отсутствием у данных препаратов гемагглютинирующих свойств.

Всего было проведено по 3 раунда биоигннинга с каждым вирусом. Полученные после каждого раунда селекции поликлональные популяции фаговых антител, а также исходные библиотеки тестировали методом ИФА для оценки изменения связывания с соответствующим вирусом, использованным для аффинного обогащения. Результаты

тестирования показали значительное прерывание сигнала при связывании антигена фаговыми популяциями, полученными после 3-го раунда селекции, над сигналом, обеспечиваемым исходными библиотеками, что подтвердило обогащение их фагами, экспонирующими на поверхности scFv антигела против ортопоксвирусов (рис. 3.).

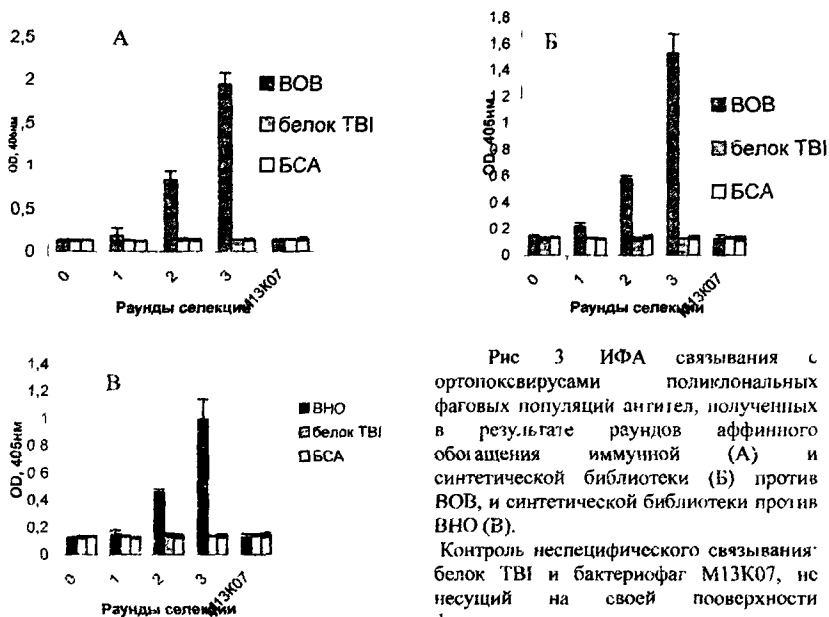


Рис. 3 ИФА связывания с ортопоксвирусами поликлональных фаговых популяций антигел, полученных в результате раундов аффинного обогащения иммунной (А) и синтетической библиотеки (Б) против BOB, и синтетической библиотеки против ВНО (В).

Контроль неспецифического связывания: белок TBI и бактериофаг M13K07, не несущий на своей поверхности фрагментов антигел.

Из популяции клонов, полученной в результате обогащения иммунной библиотеки антигелами против вируса осповакцины, 8 клонов, продуцирующих антигела (2VC3, 2VD10, 3VA10, 4VC1, 3VB7, 3VF11, 2VA8, 3VG8), оказались позитивными по связыванию вируса осповакцины в ИФА.

Из популяции клонов, полученных в результате обогащения синтетической библиотеки антигелами против вируса осповакцины, было отобрано по связыванию с вирусом осповакцины в ИФА 7 клонов, продуцирующих антигела (1F4, 10H2, 16H3, 8C5, 8G4, 10E3, 15G1). Аналогично, из популяции клонов, полученных в результате обогащения синтетической библиотеки антигелами против вируса натуральной оспы, штамм Butler, было отобрано по связыванию с вирусом натуральной оспы 7 положительных клонов, продуцирующих антигела (2B2, 2B20, 2B36, 2B34, 2B25, 2B28, 2B3).

Известно, что вирус экстремелли не является инфекционным агентом для

человека, поскольку способен размножаться лишь в организме мелких грызунов. Подобно вирусу натуральной оспы вирус экстремелии имеет одного хозяина и способен вызывать генерализованную инфекцию восприимчивого организма. Поэтому вирус экстремелии, штамм K-1, также был использован нами в качестве антигена для отбора специфических антител.

Из обогащенной против вируса осповакцины иммунной библиотеки было отобрано по связыванию с вирусом экстремелии в ИФА 10 клонов, продуцирующих антитела. Данные антитела при дальнейшем анализе оказались одинаковыми с отобранными против вируса осповакцины из этой же библиотеки.

Из синтетической библиотеки, обогащенной антителами к вирусу осповакцины, было отобрано по связыванию с вирусом экстремелии в ИФА 5 клонов, продуцирующих антитела, 3 из которых совпали с антителами, отобранными на вирус осповакцины из этой же библиотеки, а 2 (9G2 и 20A5) оказались уникальными.

Далее в ходе работы были определены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих отобранные антитела и с использованием программы «VectorNTI», баз данных IgBI AS1 и V-base проанализированы соответствующие им аминокислотные последовательности. В результате анализа последовательностей антител, отобранных из иммунной библиотеки, выяснилось, что переменные домены тяжелых цепей 7 клонов (2VC3, 2VD10, 3VA10, 4VC1, 3VB7, 2VA8, 3VF11) относились к Vh3-семейству, а переменный домен тяжелой цепи клона 3VG8 принадлежал Vh1-семейству. В то же время переменные домены легких цепей всех проанализированных клонов принадлежали к типу k-1.

В результате анализа последовательностей антител, отобранных из синтетической библиотеки, было выявлено, что переменные домены тяжелых цепей 8 антител (9G2, 8G4, 16H3, 2B28, 2B36, 2B2, 2B25, 2B34) относились Vh1-семейству, а еще 8 антител (10H2, 10E3, 20A5, 1F4, 8C5, 15G1, 2B20, 2B3) имели в своем составе переменные домены тяжелых цепей Vh3-семейства. Что касается классификации полученных последовательностей переменных доменов легких цепей антител, то Vh-домены 8 антител (8G4, 9G2, 1F4, 15G1, 10E3, 2B20, 2B34, 2B3) относились к λ3-типу, а Vh-домены еще 8 антител (16H3, 8C5, 10H2, 20A5, 2B2, 2B36, 2B28, 2B36, 2B28, 2B25) принадлежали к типу k-1.

Таким образом. Vh-домены всех отобранных из обеих библиотек антител, относились к Vh1- и Vh3-семействам. Отбор Vh-доменов, принадлежащих к этим двум семействам, из иммунной библиотеки может быть связан с тем, что данные семейства Vh-доменов представлены в человеческом организме в наибольшей степени и

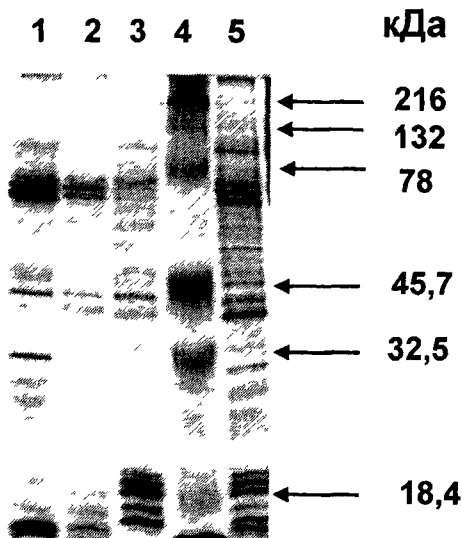
максимальном разнообразии по сравнению с остальными. Также известно, что Vh3- и Vh1-домены одноцепочечных антител обладают максимальной термодинамической стабильностью и способны принимать правильную конформацию *in vivo*, что может быть причиной отбора таких Vh-доменов из синтетической библиотеки.

Далее, все фаговые антитела, отобранные из иммунной библиотеки, исследовали в реакциях кросс-реактивного связывания с вирусами оспы коров (ВБК), экстремелии (ВЭ) и осповакцины (ВОВ) (рис. 4).

Рис. 4 Антигены, использованные в реакции кросс-реактивного связывания.

15% SDS-ПААГ. Дорожки:

1. вирус осповакцины, штамм ЛЛВП
2. вирус экстремелии, штамм К-1, очищен из ХАО РКЭ
3. вирус экстремелии, штамм К-1, очищен из культуры клеток
4. маркер молекулярных масс
5. вирус оспы коров, штамм Гришак



По результатам проведенных экспериментов, отобранные фаговые антитела можно разделить на две группы. Антитела первой группы (3VA10, 3VB7, 3VG8, 3VF11) отличаются друг от друга по связыванию исследуемых вирусов, но каждое из них выявляет приблизительно равные концентрации разных представителей данного рода (рис. 5а). Вероятно, эти антитела являются родоспецифическими. Ко второй группе относятся антитела 2VC3, 2VD10, 2VA8, связывающие разные виды ортопоксвирусов (ОПВ) с различной эффективностью (рис. 5б). При этом антитела 2VC3 и 2VD10 связывают вирусы осповакцины и экстремелии эффективнее, нежели вирус оспы коров, а антитело 2VA8 не связывает вирус экстремелии (рис. 5в). Это антитело является строго группоспецифическим. Вероятно, эпитоп, узнаваемый этим антителом, отсутствует у вируса экстремелии.

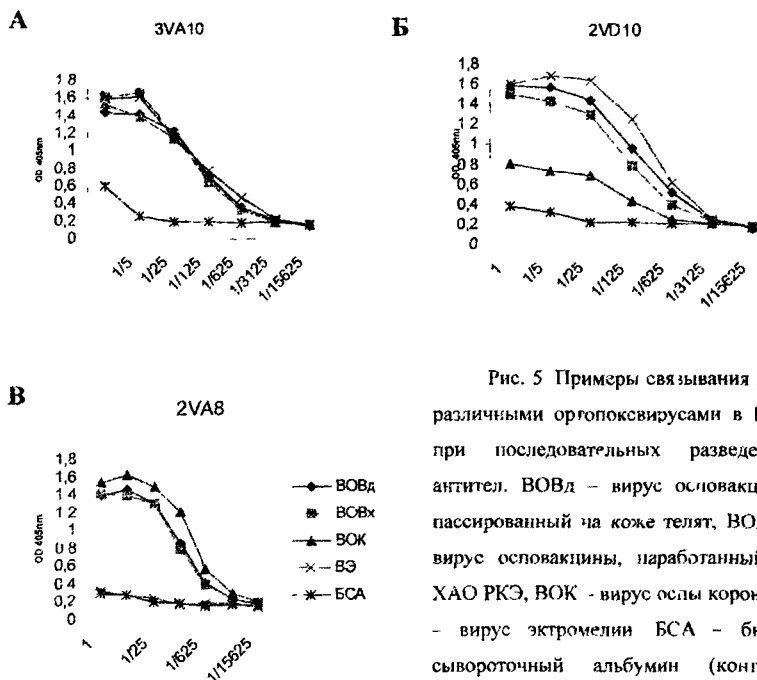


Рис. 5 Примеры связывания АТ с различными ортопоксвирусами в ИФА при последовательных разведениях антител. BOVd – вирус осповакцины, пассированный на коже телят, BOVx – вирус осповакцины, паработанный на ХАО РКЭ, BOK – вирус ослы коров, BЭ – вирус экстремелии БСА – бычий сывороточный альбумин (контроль неспецифического связывания)

Аналогично были исследованы уникальные АТ, отобранные из синтетической библиотеки против BOV, VtIO и BЭ. По результатам проведенных экспериментов, среди АТ, отобранных из синтетической библиотеки, также можно выделить антитела, способные связывать разные виды ортопоксвирусов с различной эффективностью. К этой группе относятся антитела 9G2, 20A5, отобранные по связыванию с вирусом экстремелии, и антитело 1F4, отобранное по связыванию с вирусом осповакцины. Остальные исследованные АТ выявляли приблизительно равные концентрации разных ортопоксвирусных антигенов, отличаясь при этом друг от друга по связыванию исследуемых вирусов.

Разные представители рода ортопоксвирусов обладают высоким серологическим сходством при сильно различающихся биологических свойствах, поэтому антигенная структура ортопоксвирусов являлась предметом изучения многих авторов. В настоящее время полагают, что иммунологический профиль отдельных видов ОПВ создается как из

набора родо- и видоспецифических эпитопов, так и их композиции эпитопов, складывающихся для каждого вида в определенную мозаику, причем эта мозаичная композиция вносит значительный вклад в формирование разнообразия ортопоксвирусов

В нашей работе были отобраны фаговые антитела, связывающие разные виды ортопоксвирусов с различной эффективностью. Ранее были получены коллекции мышиных МКА, специфических к различным видам ОПВ, часть МКА также продемонстрировали способность по-разному взаимодействовать с различными видами ортопоксвирусов. Исходя из полученных результатов можно предположить, что наряду с видоспецифическими эпитопами ортопоксвирусных белков существуют и общеродовые эпитопы, конформации которых имеют некоторые различия у разных видов ортопоксвирусов. Возможно, эпитопы, узнаваемые AT 1F4, 9G2, 20A5, 2VC3 и 2VD10, обладают межвидовыми конформационными отличиями, и подобные отличия вносят существенный вклад в формирование иммунологических профилей ортопоксвирусов.

В данной работе впервые была сделана попытка обнаружить штамм-специфические эпитопы вируса натуральной оспы (ВНО). Известно, что штаммы вируса натуральной оспы различаются по степени тяжести заболевания, которое они вызывают, и по уровню смертности. К *variola major* относят возбудителей, вызывавших классическое заболевание, приводившее к летальному исходу у 10 - 40% невакцинированных пациентов, тогда как смертность при заболевании, вызванном *variola minor (alastrim)*, составляла менее 1%.

Поиск штамм-специфических эпитопов проводили с помощью фаговых антител, отобранных из синтетической библиотеки по способности специфически связываться с ИФА ВОВ, ВЭ и ВНО. В работе использовали штаммы вируса натуральной оспы, относящиеся к группам штаммов как *variola major* (штаммы Ind-3a, Con-9, Kuw-5), так и *alastrim* (Butler, Brazil 131) (рис. 6). Все использованные штаммы ВНО принадлежат коллекции ГИЦ ВБ «Вектор».

Результаты экспериментов показали, что большинство фаговых антител отличались между собой по эффективности связывания исследуемых штаммов вируса натуральной оспы, по каждому из них выявляло приблизительно равные концентрации разных представителей данного вида (рис. 7). Исключение составили антитела 2B2 и 9G2 (рис. 7). Оба этих фаговых антитела эффективнее связывали штаммы группы *alastrim*, нежели штаммы *variola major*. Вероятно, эпитоп, узнаваемый фаговыми антителами 2B2 и 9G2, обладает межштаммовыми конформационными отличиями для ВНО. Следовательно, штаммы вируса натуральной оспы также могут иметь различия в иммунологических профилях за счет конформационных отличий в аналогичных эпитопах.

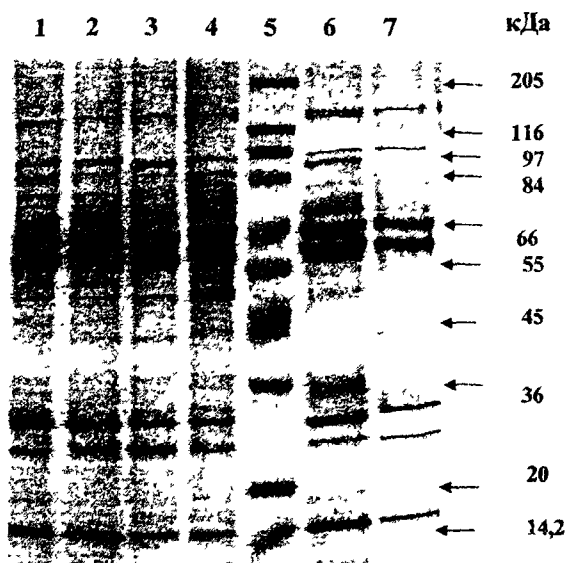


Рис. 6. Штаммы ВНО, использованные для поиска штаммоспецифических эпитопов. 15%SDS-ПААГ. Дорожки: 1 - ВНО, Brazil 131; 2 - ВНО, Butler; 3 -- ВНО, Kuw-5; 4 - ВНО, Cop-9; 5 - маркер мол. масс; 6 - ВОВ, ЛИВП; 7 - ВНО, Ind-3a.

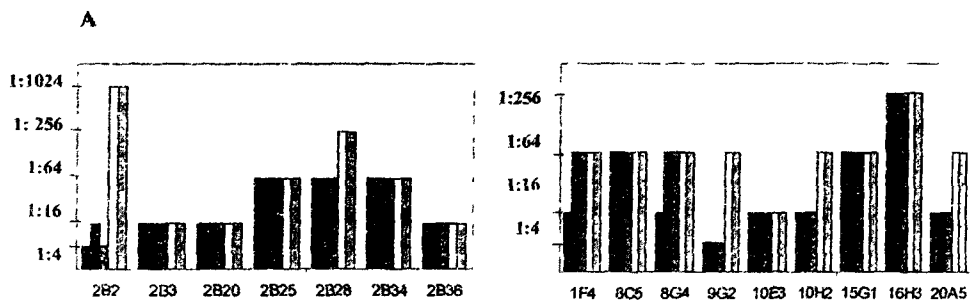


Рис. 7. Связывание фаговых аггител, отобранных против ВНО-Butler (А) и ВОВ- ЛИВП (В) с различными штаммами вируса натуральной оспы в ИФА при последовательных разведениях антигенов. Начальная концентрация вирусов 6 мкг/мл.

■ - Ind-3a, ■ - Congo-9, ■ Kuw-5, □ Butler, ▨ Brazil 131

Для фаговых антител 9G2 и 2B2 были определены белки-мишени. Для этого белки BOB (ЛИВП) и ВНО (Butler), разделенные электрофорезом в полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали с данными фаговыми АТ. Оказалось, что оба АТ выявляют белок BOB с молекулярным весом около 34 кДа и аналогичный белок ВНО (рис. 8).

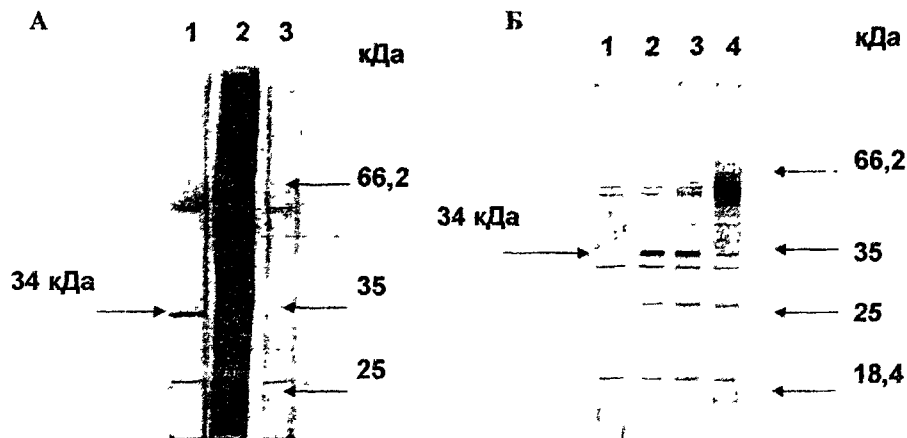


Рис. 8. Взаимодействие фаговых антител 9G2 и 2B2 с BOB (А) и ВНО (Б) в Вестерн-блот анализе. А: 1 - связывание антитела 9G2 с BOB, 2 - связывание антитела 2B2 с ВНО, 3 - связывание антитела anti-Thy с вирусом осповакцины (контроль специфичности связывания). Б: 1 - связывание антитела anti-Thy с ВНО (контроль специфичности связывания), 2 - связывание антитела 9G2 с ВНО; 3 - связывание антитела 2B2 с ВНО, 4 - связывание поликлональной фаговой популяции с ВНО.

Мы предположили, что связываемый белок является продуктом экспрессии открытой рамки трансляции (ОРТ) H3L по нумерации, соответствующей HindIII-рестрикционной карте ДНК генома Копенгаген вируса осповакцины. Белок, кодируемый ОРТ H3L, является мембранным белком внутриклеточного зрелого вириона (IMV) с молекулярным весом 34 кДа и содержит на N-конце различные аминокислотные остатки у мажорных и минорных штаммов ВНО.

Следует отметить, что гены, кодирующие V1-домены одноцепочечных антител 2B2 и 9G2, принадлежат к различным типам (табл. 1), а гены, кодирующие Vh-домены этих

антител, хотя и принадлежат к одному семейству, но имеют совершенно разные CDR3 фрагменты, структура которых, как известно, играет решающую роль в процессе узнавания антителом специфического антигена.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов нам не удалось выявить строго штаммоспецифических АТ, но были выявлены два различных фаговых АТ, которые выявляли низко вирулентные (*alastim*) штаммы эффективнее, чем остальные штаммы ВНО. Следовательно, штаммы вируса натуральной оспы также могут иметь различия в иммунологических профилях за счет конформационных отличий в аналогичных эпитопах.

Все полученные нами антитела были протестированы в реакции вируснейтрализации, то есть подавления бляшкообразования в культуре клеток VeroF6. Три антитела 3VA10, 4VC1 и 2VD10, отобранные из иммунной библиотеки, и два антитела 16H3 и 10H2, отобранные из синтетической библиотеки, обладали вируснейтрализующей активностью (табл. 1). Добавление к вирусной суспензии АТ 3VA10 и 4VC1 в концентрации приблизительно 1 нмоль/мл приводило к уменьшению количества вирусных бляшек в культуре клеток на 50% (рис. 9). В случае АТ 2VD10, 16H3 и 10H2 для получения того же эффекта необходимо было использовать концентрацию антител в 17-20 раз больше. При этом АТ 3VA10 обладало способностью нейтрализовать все исследованные ортопоксвирусы.

Так как аминокислотные последовательности антител 3VA10 и 4VC1 имеют отличия только в каркасных районах V1-домена и отличие в одном аминокислотном остатке CDR1 легкой цепи, вероятно, оба оц-АТ взаимодействуют с одним и тем же вируснейтрализующим эпитопом. В то же время, Vh-домены вируснейтрализующих АТ 3VA10 и 2VD10, отобранных из иммунной библиотеки, обладают одинаковыми CDR1, CDR2, но имеют различия в CDR3 фрагментах; кроме того, существенно различаются их V1-домены. По-видимому, данные различия имеют решающее значение для уровня вируснейтрализующей активности данных АТ.

Надо отметить, что АТ 16H3 и 10H2, отобранные из синтетической библиотеки, обладали совершенно различными последовательностями гипервариабельных районов как Vh- так и V1-доменов (табл. 1).

Все антитела, отобранные из синтетической библиотеки, были протестированы на вируснейтрализационную активность в отношении ВНО. Ни одно проверенное АТ такой активностью не обладало.

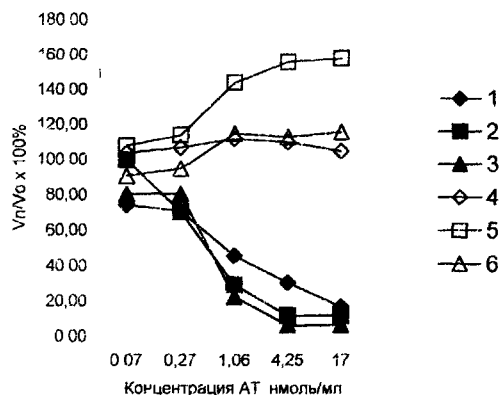


Рис 9. Реакция нейтрализации фаговым антителом 3VA10 образования бляшек ОПВ в культуре клеток VeroE6. Vn – количество бляшек в пробе, Vo – количество бляшек в контроле вируса. Графики: 1, 2, 3 – фаговое антитело 3VA10; графики 4, 5, 6 – контроль неспецифической нейтрализации (фаговое антитело anti-1hy) 1, 4 – ВОВ, 2, 5 – ВОК; 3, 6 – ВЭ.

Результаты Вестерн-блот анализа белков ВОВ, ВОК и ВЭ показали, что нейтрализующие АТ 16H3 и 10H2 не выявляли белков-мишеней, а антитела 3VA10 и 2VD10 выявляли белок ортопоксвирусов молекулярным весом около 34 кДа (рис.10). Среди структурных белков ОПВ известны 2 мембранных иммунодоминантных белка с молекулярным весом около 34 кДа, антитела к которым имеют вируснейтрализующую активность. Это белки, кодируемые OPT H3L и OPT D8L. Возможно, АТ 3VA10 и 2VD10 выявляют один из них.

Все отобранные АТ были протестированы методом Вестерн-блот анализа, и было показано, что большинство полученных АТ не выявляли белков ортопоксвирусов. Вероятно, эти АТ взаимодействовали с конформационными эпитопами, которые разрушаются при проведении электрофореза в восстановительных условиях. Кроме вышеперечисленных АТ, только фаговое антитело 1F4 выявляло белок ортопоксвирусов молекулярным весом приблизительно 27 кДа (рис. 11).

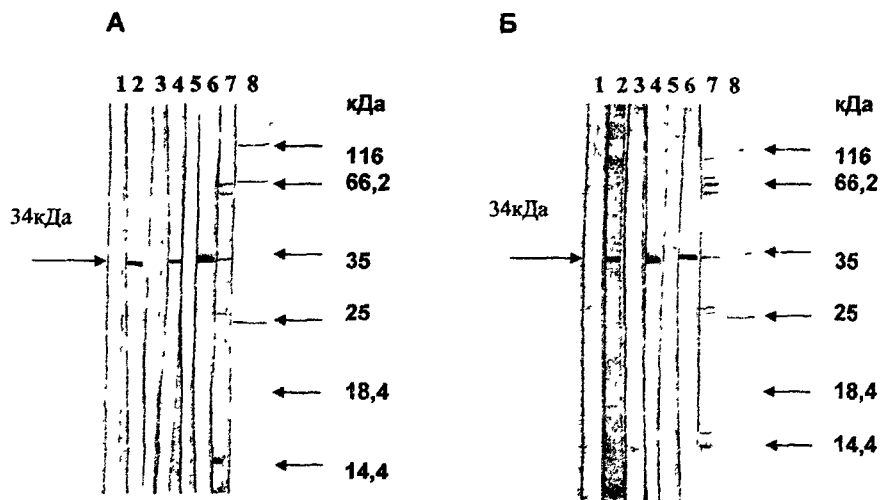


Рис.10. Взаимодействие фаговых антител 2VD10 (А) и 3VA10 (Б) с белками ортопоксвирусов в Вестерн-блот анализе: 1, 3, 5 - связывание антитела anti-Thy с ВОВ, ВОК и ВЭ соответственно (контроль специфичности связывания), 2, 4, 6 - связывание антител 2VD10 (А) и 3VA10 (Б) с белком 34 кДа ВОВ, ВОК и ВЭ, соответственно, 7 - вирус осповакцины, иммобилизованный на нитроцеллюлозной мембране, 8 - белковый маркер молекулярных весов.

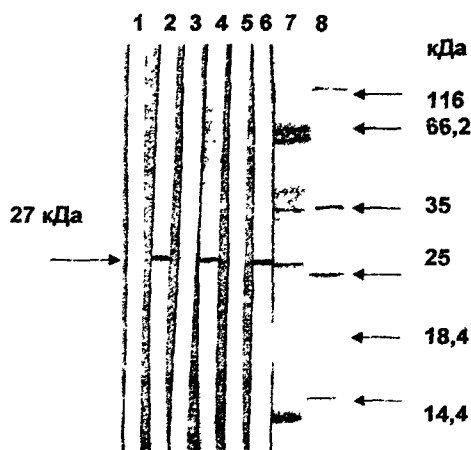


Рис.11. Взаимодействие фагового антитела 1F4 с белками ОПВ в иммуноблот-анализе:

1, 3, 5 - связывание антитела anti-Thy с ВОВ, ВОК и ВЭ соответственно (контроль специфичности связывания) 2, 4, 6 - связывание антитела 1F4 с белком 27кДа ВОВ, ВОК и ВЭ, соответственно, 7 - вирус осповакцины, иммобилизованный на нитроцеллюлозной мембране, 8 - белковый маркер молекулярных весов.

Таблица 1

oc-AT	Vh	Vl	CDR1 Vh- домена	CDR2 Vh-домена	CDR3 Vh- домена	Выявляемый в иммуноблоте белок ортопоксвирусов, кДа				Вируснейтрализующая активность			
						BOB	BOK	BЭ	BHO	BOB	BOK	BЭ	BHO
2VD10	Vh3	κ1	DYAMH	GISWNSGFIGYADSVKG	DRIAARRG	34	34	34	н.о	+	-	+	н. о.
3VA10	Vh3	κ1	DYAMH	GISWNSGFIGYADSVKG	GSIAALRGH	34	34	34	н.о	+++	+++	+++	н. о.
4VC1	Vh3	κ1	DYAMH	GISWNSGFIGYADSVKG	GSIAALRGH	34	34	34	н.о	+++	н. о	н. о	н. о
16H3	Vh1	κ1	GSAVQ	NIVVGSGNTNYAQKFQE	REDQQSKTRV	-	-	-	-	+	-	-	-
10H2	Vh3	κ1	NHYTS	YSSGNSGYINYADSVKG	YTAIFLDY	-	-	-	-	+	-	-	-
1F4	Vh3	λ3	DYYMS	YISSSGSTIYYADSVKG	NKKKGKFAE	27	27	27	27	-	-	-	-
9G2	Vh1	λ3	SYAMH	WINAGNGNTKYSQKFQG	RIRLRIGTK	34	34	34	34	-	-	-	-
2B2	Vh1	κ1	SYAMH	WINAGNGNTKYSQKFQG	RSLRPAGPH	34	34	34	34	-	-	-	-

Таким образом, в ходе проделанной работы впервые были отобраны бактериофаги, экспонирующие на своей поверхности одноцепочечные антитела человека против вируса натуральной оспы, штамм Butler, против вируса осповакцины и вируса экстремелии. Определены аминокислотные последовательности полученных антител. Исследовано связывание полученных антител с жизнеспособными ортопоксвирусами, включая различные штаммы вируса натуральной оспы, показана способность полученных антител к кросс-реактивному связыванию различных представителей этого рода. Выявлены группоспецифические антитела, впервые обнаружены антитела, обеспечивающие различное связывание штаммов вируса натуральной оспы, обладающих разной вирулентностью (*variola major* и *variola alastrim*). Часть антител из полученной коллекции связывали эпитопы ортопоксвирусов, обладающие межвидовыми и межштаммовыми конформационными отличиями, а одно антитело являлось группоспецифическим, т.е. взаимодействовало с эпитопом, отсутствующим на поверхности вируса экстремелии. Кроме того, в ходе данной работы впервые были отобраны одноцепочечные антитела человека, способные подавлять инфекционность вирусов осповакцины, оспы коров и экстремелии.

ВЫВОДЫ

1. Впервые получены фаговые одноцепочечные антитела человека против вируса натуральной оспы, вируса осповакцины и вируса экстремелии. Определены аминокислотные последовательности полученных антител и показано, что V-сегменты тяжелых цепей полученных антител относятся к семействам Vh1 и Vh3 иммуноглобулинов человека, а V-сегменты легких цепей принадлежат к k1 и l3-подтипам.
2. Исследовано связывание полученных антител с ортопоксвирусами, выявлены антитела, обеспечивающие различное связывание вирусов осповакцины, оспы коров и экстремелии, отобрано группоспецифическое антитело, узнающее эпитоп, который отсутствует на поверхности вируса экстремелии.
3. Впервые обнаружены антитела, обеспечивающие различное связывание штаммов вируса натуральной оспы *Variola major* (штаммы Ind-3a, Con-9, Kuw-5) и *variola minor* (штаммы Butler, Brazil131).
4. Впервые выявлены одноцепочечные антитела человека, способные подавлять инфекционность вирусов осповакцины, оспы коров и экстремелии и показано, что эти антитела связывают белок ортопоксвирусов с молекулярным весом приблизительно 34 кДа.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. N.V.Tikunova, V.V.Morozova, T.A.Batanova, E.F.Belanov, N.I.Bormotov, A.A.Ilyichev. Phage antibodies from combinatorial library neutralize vaccinia virus.//Human antibodies and Hybridomas, – 2002 – V.10 - P 95-99
2. Н.В. Гикунова, Е.Ф. Беланов, В.В. Морозова, Т.А. Батанова, Н.И. Бормотов, Ч.Г. Овечкина, А.А. Ильичев, академик Л.С. Сандахчиев. Фаговые антитела способны нейтрализовать вирус осповакцины // Доклады Академии наук – 2002 – т. 382, №1, С. 124-126
3. В.В. Морозова, Н.В. Гикунова, Т.А. Батанова, Т.Э. Юн., Е.И. Бовшик, Е.В. Жираковская, В.В. Ворошина, Д.И. Бобко, Е.Ф. Беланов, А.А. Ильичев, Л.С. Сандахчиев. Мицеллы-антитела человека против ортопоксвирусов // Вестник РАМН - 2004 - № 8 С. 22-27
4. Н.В.Тикунова, Е.И.Бовшик, Т.Э.Юн., Е.В.Жираковская, В.В.Морозова, Т.А.Батанова, А.А.Гуськов, Е.Б.Сокупова, А.А.Ильичев, Л.С.Сандахчиев. Рекомбинантные антитела человека против вируса натуральной оспы.//Вопросы вирусологии. - 2005 - №6 С. 20-25
5. Воронина В.В., Тикунова Н.В., Морозова В.В., Бормотов Н.И., Ламан А.Г., Улитин А.Б., Бровко Ф.А., Беланов Е.Ф., Ильичев А.А. Комбинаторная фаговая библиотека одноцепочечных антител человека, обогащенная антителами против вируса осповакцины, рекомбинантная фагмидная ДНК рHEN-3A10, содержащая уникальный ген одноцепочечного антитела человека, способного нейтрализовать ортопоксвирусы, и искусственное одноцепочечное антитело человека 3A10, способное нейтрализовать ортопоксвирусы.// Заявка на патент РФ. Справка о приоритете № 2005125994 от 15.08.05
6. Morozova V.V., Belanov E.F., Batanova T.A., Tikunova N.V. "Selection of single-chain antibodies to vaccinia virus from combinatorial libraries" 5th John Humphrey Advanced Summer Programme in Immunology, 2000, Puschino, Russia
7. V.V.Morozova, E.F.Belanov, T.A.Batanova, N.V.Tikunova. Selection of single-chain antibodies to vaccinia virus from combinatorial phage library //Human Antibodies and Hybridomas, 2001, Conference, Prague, Czech Republic. Human Antibodies, 2001, V.10, №1, P.27-28.
8. Ilyichev A.A., Morozova V.V., Batanova T.A., Tikunova N.V. Human

- miniantibodies against orthopoxviruses. //Human antibodies and Hybridomas, Conference, 2002, Berne, Switzerland. Human antibodies, 2002, V.11, № 1-2 P.23.
9. Ilyichev A.A., Morozova V.V., Tikunova N.V., Belanov E.F., Batanova T.A. Characterization of orthopoxvirus antigenic profile using combinatorial phage antibodies.XII International Congress of Virology, 2002, Paris, France Book of abstracts, P.460.
 10. 15th International conference on antiviral research Prague, Czech Republic. 2002. Antiviral research - 2002 - V.53, P. A64 Морозова В.В., Батанова Т.А., Беланов Е.Ф., Бормотов Н.И., Ильичев А.А., Тикунова Н.В. Иммунохимические и биологические свойства рекомбинантных моноклональных антител человека против вируса осповакцины. II Научная конференция «Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера». 2002. Новосибирск. С.253.
 12. Бовшик Е.И., Тикунова Н.В., Гуськов А.А., Морозова В.В., Юн Т.Э., Жираковская Е.В., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С. Получение рекомбинантных антител человека против вируса натуральной оспы. Международная конференция «Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера» 2002, Новосибирск. С 253.
 - 13 Морозова В.В., Батанова Т.А., Беланов Е.Ф., Бормотов Н.И., Ильичев А.А., Тикунова Н.В. Иммунохимические и биологические свойства рекомбинантных моноклональных антител человека против вируса осповакцины. Международная научно-практическая школа-конференция "Цитокины.Воспаление.Иммунитет." Санкт-Петербург, Россия - 2002
 14. Bovshik E.I., Yun T.E., Morozova V.V., Guskov A.A., Zhirakovskaya E.V., Ilyichev A.A., Tikunova N.V Development of combinatorial human antibodies to variola virus. 6th John Humphrey Advanced Summer Program in Immunology, 2002, Puschino, Russia.
 15. N.V.Tikunova, V.V.Morozova, E.I.Bovshik, E.F.Belanov, A.A.Guskov, T.E.Yun, A.A.Ilyichev, L.S.Sandakhchiev Combinatorial antibodies against orthopoxviruses. 16th International conference on antiviral research Savannah, Ga, USA 2003 Antiviral research. 2003 - V 57. P. A73

- 16 E.I.Bovshik, I.E.Yun, E.V.Zhirakovskaya, V.V. Morozova, A.A.Guskov, T.A.Batanova, A.A.Ilyichev, N.V.Tikunova. Combinatorial Antibodies against Orthopoxviruses. 17th International conference on antiviral research. Tucson, USA 2004. Antiviral research. 2004 V 62. P. A62.
17. V.V.Morozova, V.V.Voronina, 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 A83.



Подписано к печати 21 ноября 2005г.
Тираж 100 экз. Заказ № 1696.
Отпечатано "Документ-Сервис", 630090,
Новосибирск, Институтская 4/1, тел. 335-66-00

№ 25063

РНБ Русский фонд

2006-4
29968