МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Ильина Екатерина Николаевна

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ К ГЛИКОПРОТЕИНУ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ДЛЯ ПОСТЭКСПОЗИЦИОННОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

03.01.08 – Биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научные руководители: ***Алиев Теймур Кантамирович***, *кандидат химических наук*

Долгих Дмитрий Александрович, *доктор биологических наук*

Официальные оппоненты: ***Карпова Ольга Вячеславовна,*** *доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой вирусологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»*

Филатов Александр Васильевич, *доктор биологических наук, заведующий лабораторией иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Институт иммунологии ФМБА России»*

Жердев Анатолий Виталиевич, *кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии имени А.Н. Баха*

Защита состоится 04 декабря 2019 года в 16:30 на заседании диссертационного совета МГУ 03.04 Московского государственного университета имени М. В.Ломоносова» по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 406.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М. В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский просп., д. 27, отдел диссертаций) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: https://istina.msu.ru/dissertations/243984139/

Автореферат разослан «___» ноября 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук И.В. Шаповалова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Бешенство – одно из самых опасных зоонотических инфекционных заболеваний, поскольку является летальным для человека в абсолютном большинстве случаев. Даже сейчас, в XXI веке, бешенство входит в список важнейших угроз для здоровья человека. Болезнь представлена на всех континентах, за исключением Антарктиды, а наибольшее количество случаев заражения происходит в Африке и Азии, где ежегодно регистрируется несколько десятков тысяч смертей. Однако данные о количестве летальных случаев в результате заражения вирусом бешенства (RABV, Rabies virus) оцененные в 60 000 человек в год, являются неполными из-за отсутствия соответствующего эпидемиологического надзора и лабораторной инфраструктуры [Fisher C. R., 2018]. Почти все случаи заражения людей RABV связаны с укусами зараженных собак, при этом чаще всего страдают дети младше 15 лет.

Бешенство продолжает оставаться серьезной проблемой для здравоохранения во всем мире, особенно в развивающихся странах. Предотвращение смертельных случаев в результате заражения RABV может быть достигнуто при использовании современных вакцин как до, так и после инфицирования вирусом. В дополнение к вакцинам в большинстве случаев инфицирования человека для повышения эффективности противовирусной профилактики рекомендуется введение антирабического иммуноглобулина (RIG, Rabies immunoglobulin). Для пассивной иммунизации кроме антирабического иммуноглобулина лошади (Equine rabies immunoglobulin, ERIG) также используется донорский антирабический иммуноглобулин человека (Human rabies immunoglobulin, HRIG). Однако недостаточное количество RIG, особенно HRIG, является актуальной проблемой. При этом поликлональные сыворотки иммуногенны для человека, что исключает возможность их повторного использования [Tepsumethanon S., 2007]. В соответствии со стратегией Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) моноклональные антитела (мАТ) человека или гуманизированные мАТ могут обеспечить наилучшую альтернативу для профилактики развития бешенства у человека [Dietzschold B., 1987].

Цель и задачи исследования

Цель данной работы заключалась в получении рекомбинантных моноклональных антител с высокой вируснейтрализующей активностью для создания иммунотерапевтического средства пост-экспозиционной профилактики заболевания бешенством у людей.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести конструирование полноразмерного мАТ 1C5 к гликопротеину вируса бешенства (ГПВБ) на основе полученной ранее последовательности вариабельных доменов.
2. На основе В-лимфоцитов периферической крови человека осуществить получение клонов гетерогибридом, продуцирующих полностью человеческие антитела к ГПВБ и выделение из клеток положительных клонов гетерогибридом нуклеотидных последовательностей, кодирующих человеческие антитела.
3. Провести конструирование кодирующих последовательностей референтных мАТ CR4098 и CR57 (Crucell).
4. Разработать систему экспрессии полноразмерных антител в клетках CHO, осуществить выделение и очистку целевых белков.
5. Провести количественную оценку вируснейтрализующую активность полученных рекомбинантных мАТ к ГПВБ методом FAVN.
6. Осуществить иммунохимическую характеризацию полученных рекомбинантных мАТ к ГПВБ.
7. Провести определение вируснейтрализующей активности полученных мАТ к ГПВБ в интрацеребральном тесте на мышах Balb/c с использованием вируса бешенства штамм CVS 11.

Научная новизна работы

1. Получено гуманизированное мАТ 1C5 в формате полноразмерного иммуноглобулина IgG1-изотипа.
2. Получены гетерогибридомы на основе В-лимфоцитов человека, продуцирующие мАТ к ГПВБ, проведен молекулярно-генетический анализ последовательностей вариабельных доменов мАТ человека к ГПВБ.
3. Методом флюоресцентного вируснейтрализующего теста с использованием вируса бешенства CVS-11 изучена нейтрализующая активность исследуемых мАТ 1C5, мАТ 6B2 и мАТ RabD4.

4. Используя ряд иммунохимических методов, проведено исследование свойств и характера взаимодействия рекомбинантных мАТ 1C5, мАТ 6B2 и мАТ RabD4 с ГПВБ.
5. Определены параметры вируснейтрализующей активности мАТ методом интрацеребрального теста на мышах.

Практическая значимость исследования

Полученные мАТ 1C5 и мАТ RabD4 могут быть использованы для разработки препарата для постэкспозиционной профилактики (ПЭП) бешенства у людей. Также использованные в работе современные технологии биоинженерии и биосинтеза рекомбинантных антител, в том числе полностью человеческих, могут быть востребованы при проведении подобных исследований в отношении других антигенов.

Положения, выносимые на защиту

1. Проведено конструирование полноразмерного гуманизированного мАТ 1C5, содержащего человеческую легкую цепь каппа-изотипа и тяжелую цепь IgG1-изотипа;
2. Создание гетерогибридных клеток на основе В-лимфоцитов человека, выделенных из иммунного донора, с последующей стимуляцией *in vitro* позволило получить новые человеческие мАТ 6B2 и мАТ RabD4 к ГПВБ;
3. Было проведено конструирование нуклеотидных последовательностей, кодирующих референтные мАТ CR57 и мАТ CR4098 (Crucell) для изучения антигенной специфичности исследуемых мАТ 1C5, мАТ 6B2 и мАТ RabD4;
4. Полученные мАТ 1C5 и мАТ RabD4 проявляют высокую нейтрализующую активность против вируса бешенства штамм CVS-11, 1458 МЕ/мг и 829,8 МЕ/мг, соответственно.
5. Полученные мАТ 1C5 и мАТ RabD4 взаимодействуют с неперекрывающимися антигенными сайтами ГПВБ, при этом связывание характеризуется высоким значением константы диссоциации комплекса мАТ-ГПВБ: $6{,}6\times10^{-9}$ М и $2{,}2\times10^{-9}$ М, соответственно.
6. мАТ 1C5 и мАТ RabD4 обладают протективной нейтрализующей активностью в отношении вируса бешенства, что было установлено в интрацеребральном тесте на мышах с использованием вируса бешенства штамма CVS-11.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на 7 конференциях: the 43th FEBS Congress, Прага, Чехия, 2018; Международный семинар «Серодиагностика как метод оценки эффективности антирабических мероприятий», Санкт-Петербург, 2018; Международный Форум "Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни" (BIOTECH WORLD 2018), Москва, 2018; 22-я Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века», Пущино, 2018; Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды". Москва, 2017; XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов – 2017", Москва, 2017; XXIX Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, 2017. Апробация работы была проведена на заседании кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Публикации

Были опубликованы 3 статьи в журналах, индексируемых Web of Science и Scopus. Все статьи опубликованы в журналах, входящих в перечень, принятый МГУ им. М.В. Ломоносова.

Личный вклад автора в проведение исследования

Личный вклад заключается в планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе результатов, обзоре литературы, представлении и апробации результатов проведенных исследований на конференциях, написании и подготовке научных публикаций по выполненной работе.

Структура и объем диссертации

Диссертация включает разделы: список используемых сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы, состоящий из 110 источников. Работа изложена на 115 страницах, содержит 11 таблиц, 29 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты и их обсуждение

ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИОННОЙ КОНСТРУКЦИИ, КОДИРУЮЩЕЙ ПОЛНОРАЗМЕРНОЕ ГУМАНИЗИРОВАННОЕ мАТ 1С5

Для получения VH и VL гуманизированного мАТ 1С5 [Беневоленский С.В., 2012] был использован метод химико-ферментативного синтеза с использованием набора попарно перекрывающихся праймеров.

Для создания полноразмерного мАТ 1С5 был выбран изотип HC IgG1 и к – для LC, так как подавляющее число терапевтических препаратов антител приходится на долю IgG, а именно изотипа IgG1 [Salfeld J., 2007]. Данный класс иммуноглобулинов в норме преобладает в сыворотке крови человека по сравнению с остальными классами (IgA, IgM, IgE и IgD), при этом наибольшее содержание в крови характерно для антител IgG1-изотипа, которые составляют 60% от всех молекул класса IgG [Jefferis R., 2007]. Антитела, относящиеся к изотипу IgG1, обеспечивают антителозависимую клеточную цитотоксичность и активацию системы комплемента – механизмы, необходимые для нейтрализации вируса. Также антитела IgG1-изотипа характеризуются длительным временем полужизни в кровотоке [Alyanakian M., 2003].

ПОЛУЧЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ГПВБ

Следующим этапом работы явилось получение новых антител в дополнение к мАТ 1С5. Получение и использование в комбинации мАТ способных к нейтрализации вируса бешенства и характеризующихся разной эпитопной специфичностью, позволит снизить вероятность ухода от нейтрализации отдельных мутантных штаммов вируса бешенства, тем самым повысив эффективность профилактики.

При этом было решено, что дополнительные мАТ должны быть человеческими по своей природе, так как они являются минимально иммуногенными молекулами.

Для этого из человеческой периферической крови иммунизированного донора были выделены и заморожены три аутологичных клеточных субпопуляции: CD4+ Т-лимфоциты; В-лимфоциты; моноциты. Для стимуляции В-лимфоцитов необходимо наличие антигена в растворе, а также присутствие зрелых дендритных клеток, способных презентировать этот же антиген. В связи с этим из выделенных ранее моноцитов были получены зрелые дендритные клетки, нагруженные ГПВБ. Стимуляция В-лимфоцитов была выполнена в присутствии CD4+ Т-лимфоцитов, зрелых дендритных клеток,

цитокинов, митогена и ГПВБ. На следующем этапе на основе полученных человеческих В-клеток были созданы гетерогибридомы.

Как правило, гибридизация клеток разного видового происхождения приводит к образованию генетически нестабильных гибридов [Smith S. A., 2015]. Для преодоления этого ограничения предварительно была получена гетерогибридома человек-мышь на основе миеломы NS1, со временем утратившая способность к антителопродукции. И уже данная, ничего не продуцирующая гетерогибридома была использована для соматической гибридизации с иммунными В-лимфоцитами человека [Kalantarov G. F., 2002].

Для отбора гибридомных клонов, продуцирующих человеческие антитела против ГПВБ, был использован сэндвич-метод ИФА по схеме мышиное мАТ 1С5 – вакцина Рабипур – супернатант гетерогибридомы – анти-IgG антитело-HRP. Далее клетки были клонированы методом предельных разведений, в результате чего были отобраны стабильные клоны RabD4 и 6B2.

Для дальнейшей характеристики мАТ RabD4 и мАТ 6B2 были получены в рекомбинантном виде. Для этого из клеток гетерогибридомы RabD4 и 6B2 была выделена суммарная РНК и получена кДНК, на матрице которой с помощью генспецифических праймеров амплифицированы нуклеотидные последовательности, кодирующие VL и VH мАТ RabD4 и мАТ 6B2.

Аминокислотные последовательности вариабельных доменов новых человеческих мАТ RabD4 и 6B2 были картированы в соответствии с номенклатурой Kabat [Kabat E.A., 1991] и представлены на рисунках 1-4.

1 EVQLLESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFS NHAMSWVRQA PGKGLEWIST

51 ISGSGGRTYY TDSVAGRFTI SRDNSEYTLY LQMNSLTAED TAVYSCARDI

101 IPLAGTGLDY WGQGTLVTVS S

Рисунок 1. Аминокислотная последовательность VH мАТ RabD4 к ГПВБ (121 а.о.). Красным цветом выделены CDR-участки в соответствии с нумерацией Kabat

1 QSVLTQPPSA SGTPGQRVTI SCSGSSSNIR DNTVHWYQLL PGTAPKLLIY

51 SDNQRPSGVP DRFSGSKSGS SASLAISGLQ SEDEADYYCA AWDDSLNGLY

101 VFGTGTKVTV LR

Рисунок 2. Аминокислотная последовательность VL мАТ RabD4 к ГПВБ (112 а.о.). Красным цветом выделены CDR-участки в соответствии с нумерацией Kabat

1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV

51 IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG

101 EYYYGSGSYY NYYYYYGMDV WGQGTTVTVS S

Рисунок 3. Аминокислотная последовательность VH мАТ 6B2 к ГПВБ (131 а.о.). Красным цветом выделены CDR-участки в соответствии с нумерацией Kabat

1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY

51 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPPYTF

101 GQGTKLEIK

Рисунок 4. Аминокислотная последовательность VL мАТ 6B2 к ГПВБ (109 а.о.). Красным цветом выделены CDR-участки в соответствии с номенклатурой Kabat

ПОЛУЧЕНИЕ ПЛАЗМИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ НОВЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ мАТ 6B2, RABD4 И 1C5, А ТАКЖЕ КОНТРОЛЬНЫХ мАТ CR57 И CR4098

Рекомбинантные полноразмерные мАТ были получены с помощью транзиентной экспрессии. Для этого была выбрана биплазмидная система на основе вектора pcDNA 3.4. Для продукции антител в культуральную среду в экспрессионные кассеты были добавлены последовательности лидерных пептидов. Также на 5’-конец каждой цепи антитела была добавлена последовательность Козак, важная для инициации трансляции (рисунок 5).

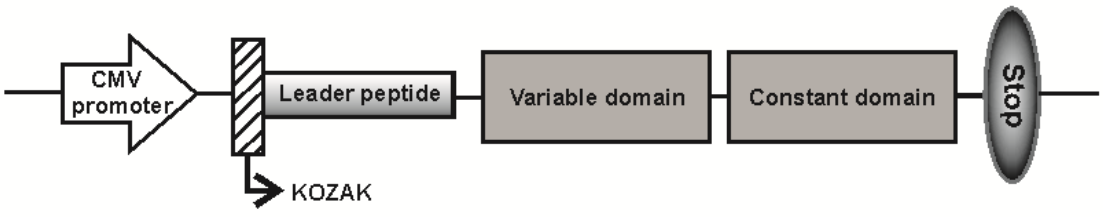

Рисунок 5. Схема экспрессионной кассеты для получения полноразмерных мАТ в клетках CHO методом транзиентной экспрессии

По итогам клонирования цепей антител в вектор pcDNA3.4, трансформации *E.coli* XL-1 Blue полученной конструкцией были выделены положительные клоны, содержащие экспрессионные плазмиды, которые в дальнейшем были использованы для транзиентной трансфекции клеток CHO (рисунок 6, 7).

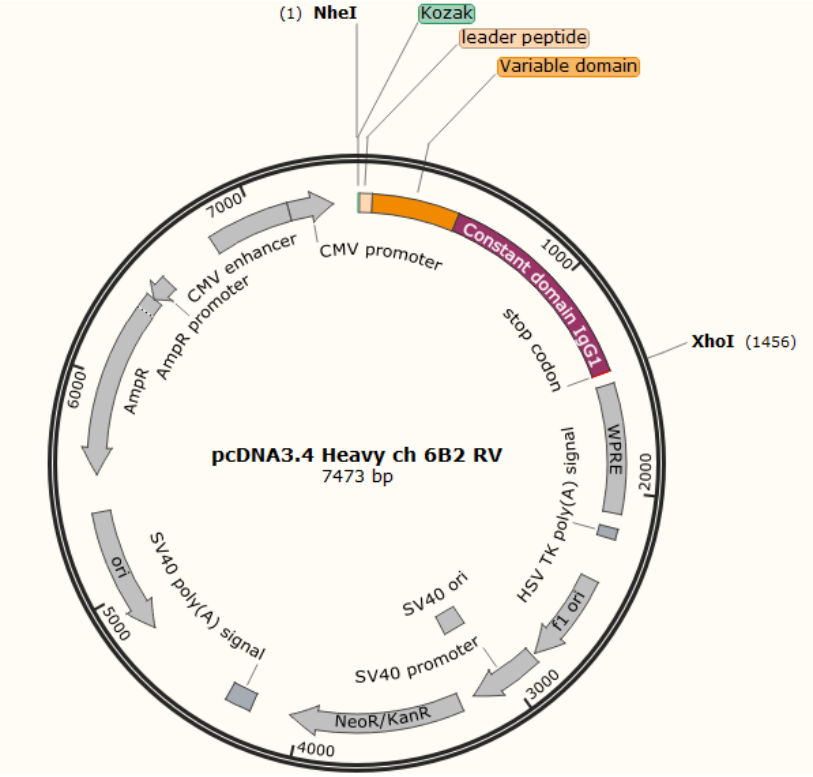

Рисунок 6. Схема экспрессионной плазмиды, кодирующей HC рекомбинантного мАТ (на примере мАТ 6B2)

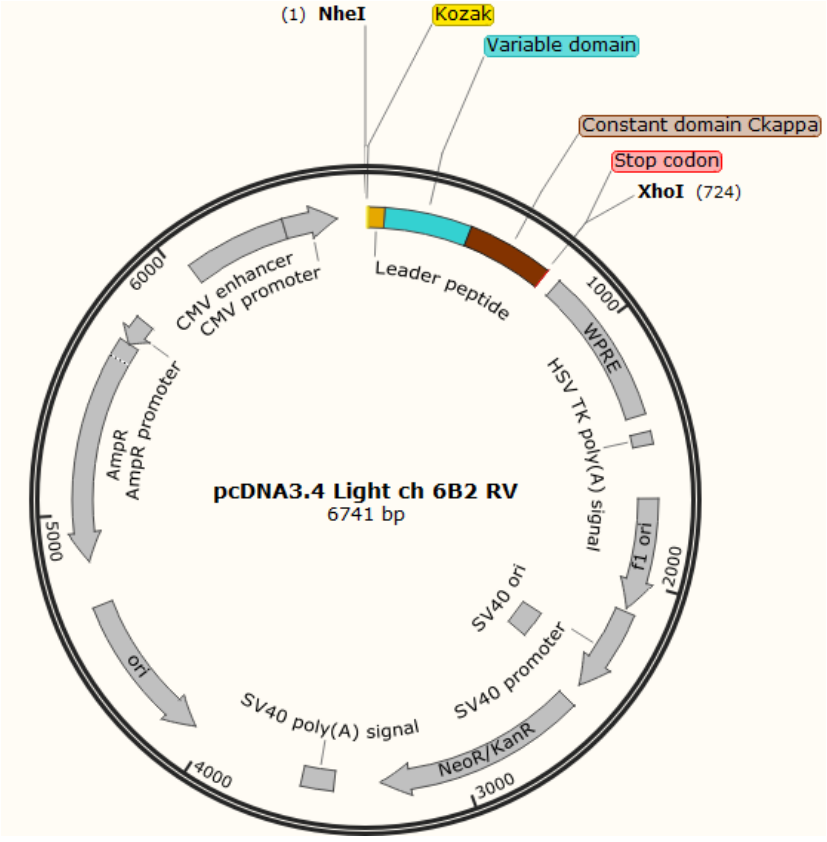

Рисунок 7. Схема экспрессионной плазмиды, кодирующей LC рекомбинантного мАТ (на примере мАТ 6B2)

Чистота экспрессионных плазмид строго контролировалась на отсутствие РНК, при необходимости выполнялась обработка РНКазой, с последующим переосаждением.

БИОСИНТЕЗ И ВЫДЕЛЕНИЕ

Для продукции целевых белков, новых человеческих мАТ 6B2 и RabD4, гуманизированного мАТ 1C5, а также контрольных мАТ CR57 и CR4098, в виде полноразмерных молекул была выбрана эукариотическая экспрессионная система на основе клеток CHO.

Клетки CHO трансфицировали двумя плазмидами, сконструированными на основе вектора pcDNA3.4, несущими отдельно (LC) и (HC) цепи соответствующего мАТ. При трансфекции использовали избыток плазмиды, кодирующей LC, по отношению к плазмиде, кодирующей HC.

Рекомбинантные полноразмерные мАТ выделяли с помощью аффинной хроматографии на протеин-А-сефарозе. Обе цепи каждого из антител, HC и LC, были выявлены в растворимом белковом препарате, выделенном из супернатанта в результате экспрессии в клетках CHO, как основные полосы, мигрирующие в ПААГ в соответствии с ожидаемыми молекулярными массами 52-55 кДа и 26-28 кДа, соответственно (рисунок 8, 9). Продуктивность используемой транзиентной системы экспрессии составила от 120 до 200 мг/л среды культивирования.

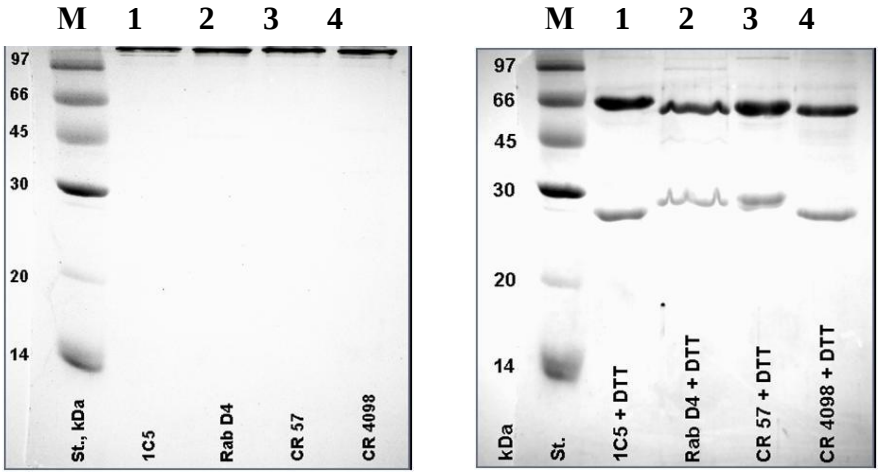

Рисунок 8. 12% SDS-PAGE образцов в невосстанавливающих условиях (без ДТТ) и в восстанавливающих условиях (с ДТТ). М – маркеры молекулярных масс

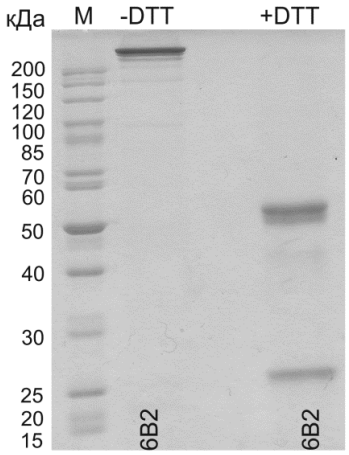

Рисунок 9. 10% SDS-PAGE образцов в восстанавливающих условиях (с ДТТ) и в невосстанавливающих условиях (без ДТТ). М – маркеры молекулярных масс

Дополнительная очистка полученных рекомбинантных мАТ осуществлялась с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (рисунки 10-11). Для проведения препаративной или аналитической гель-фильтрационной хроматографии использовали колонку Superdex 200-10/300-GL (GE Healthcare, США). Таким образом были детектированы и удалены мультимерные нековалентно связанные формы мАТ (результаты показаны на примере очистки мАТ CR4098 на рисунке 12).

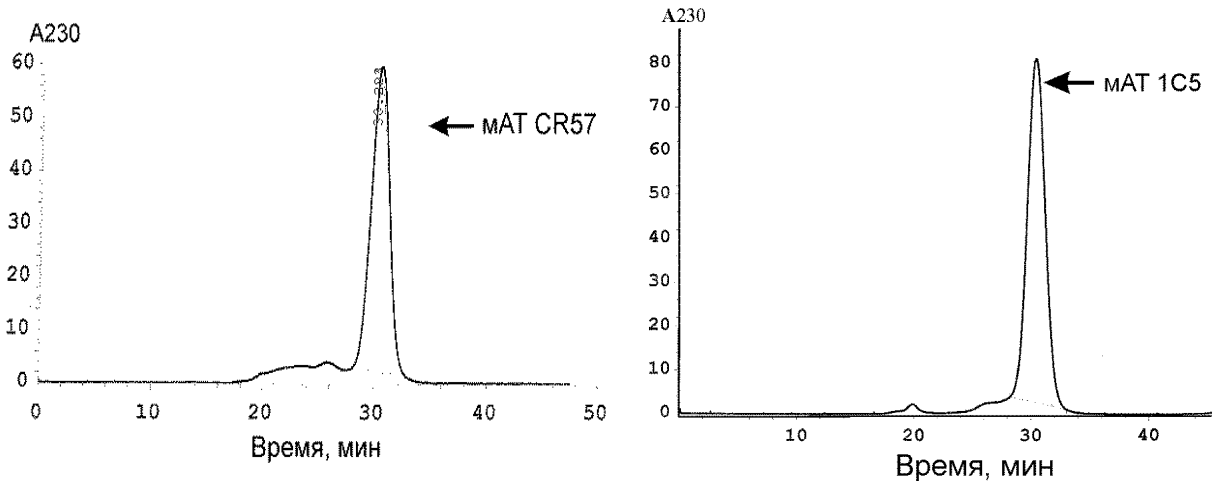

Рисунок 10. Результаты аналитической ВЭЖХ образцов мАТ CR57 и 1C5 на колонке Superdex 200- 10/300 GL

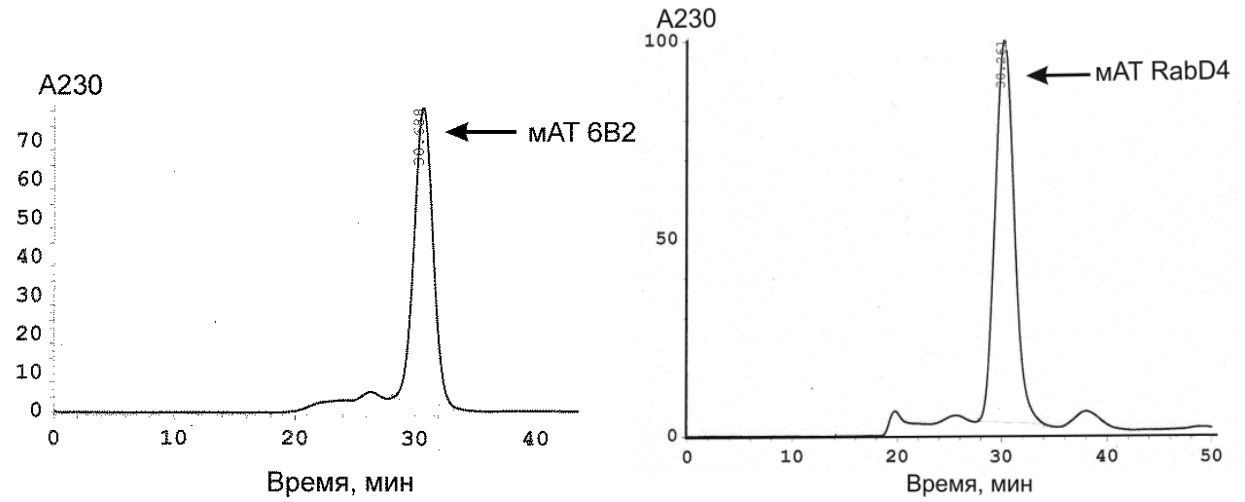

Рисунок 11. Результаты аналитической ВЭЖХ образцов мАТ 6B2 и RabD4 на колонке Superdex 200- 10/300 GL

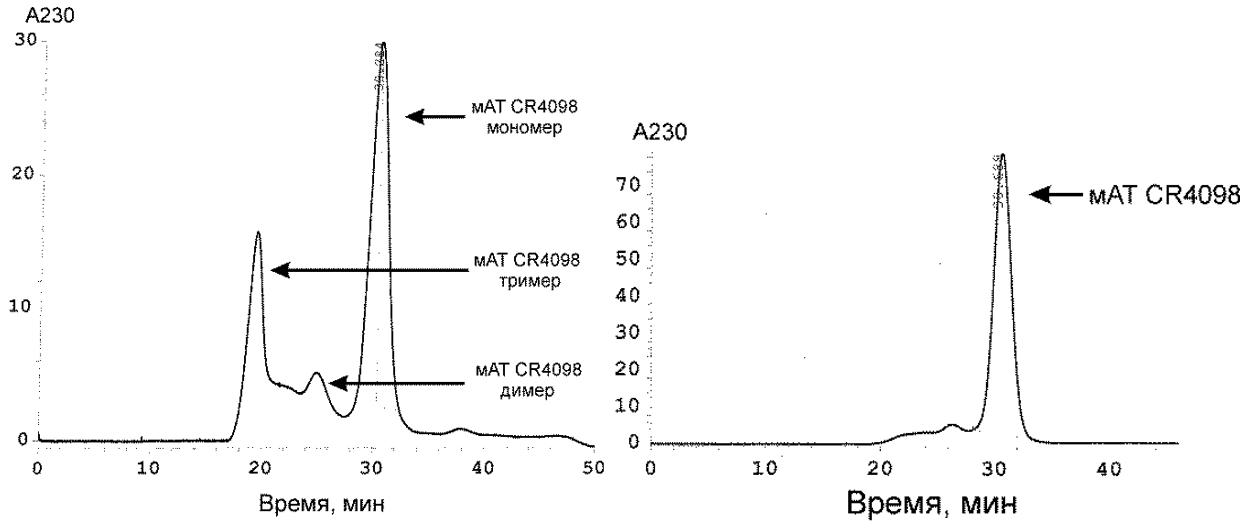

Рисунок 12. Результаты аналитической ВЭЖХ экспериментального образца мАТ CR4098 на колонке Superdex 200- 10/300 GL до и после дополнительной стадии очистки с помощью гель-фильтрационной хроматографии

Чистота полученных образцов рекомбинантных мАТ составила не менее 95%. Таким образом, было показано, что разработанный метод наработки, выделения и очистки позволяет получать высокоочищенные рекомбинантные полноразмерные мАТ для анализа их функциональной активности.

ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ мАТ

В первую очередь все мАТ тестировались на способность осуществлять нейтрализацию вируса бешенства. Входящие в состав разрабатываемого препарата мАТ

для ПЭП должны не только специфично связываться с высоким сродством с молекулами ГПВБ, но такое взаимодействие должно препятствовать прикреплению вируса бешенства к клеточным рецепторам и проникновению внутрь клетки, то есть мАТ должно обладать вируснейтрализующими свойствами. Известно, что в процессе развития иммунного ответа образуются антитела, специфичные к различным антигенным детерминантам вируса, или даже к различным эпитопам одной молекулы. Однако связывание не с каждым эпитопом вирусного белка приводит к нейтрализации вируса и предотвращению развития инфекции [Irie T., 2005].

Для исследования вируснейтрализующей активности новых рекомбинантных мАТ: 1C5, RabD4 и 6B2, использовали флюоресцентный вируснейтрализующий тест FAVN с применением стандартного штамма вируса бешенства CVS-11 [Cliquet F., 1998]. Дополнительно в тестирование были включены в качестве положительных контролей наработанные в данной работе два известных мАТ к ГПВБ, CR57 и CR4098 (Crucell), с подтвержденной нейтрализующей активностью в тестах не только *in vitro*, но и *in vivo* [de Kruif J., 2007]. Вируснейтрализующую активность всех исследуемых антител определяли в сравнении с международным стандартом ВОЗ антирабического иммуноглобулина с известной активностью и выражали в международных единицах с учетом концентрации мАТ (МЕ/мг).

Таблица 1. Результаты исследования антирабической активности образцов мАТ методом FAVN с использованием культурального штамма вируса бешенства CVS-11

Образец	**Значения антирабической активности мАТ, МЕ/мг**
мАТ 1C5	1458,72
мАТ RabD4	829,8
мАТ 6B2	0
мАТ CR4098	463,3
мАТ CR57	788,1

Результаты теста FAVN показали, что мАТ 1C5 и RabD4 являются высоконейтрализующими, как и мАТ сравнения CR57 и CR4098 (в таблице 1 приведены усредненные значения, полученные после 3 независимых измерений). Для мАТ 6B2 вируснейтрализующая активность не была установлена, поэтому оно было исключено из дальнейшей работы. Это согласуется с выводом Bakker et al. [Bakker A. B., 2005], что нейтрализующая активность не коррелирует с аффинностью взаимодействия.

ПРОВЕРКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ мАТ В НЕПРЯМОМ ИФА

Для проверки функциональной активности мАТ RabD4 и 1С5 был проведен непрямой ИФА с использованием нативного ГПВБ (штамм “Внуково-32”) в качестве антигена. В эксперимент также были включены референтные мАТ CR4098 и CR57, результаты приведены на рисунке 13.

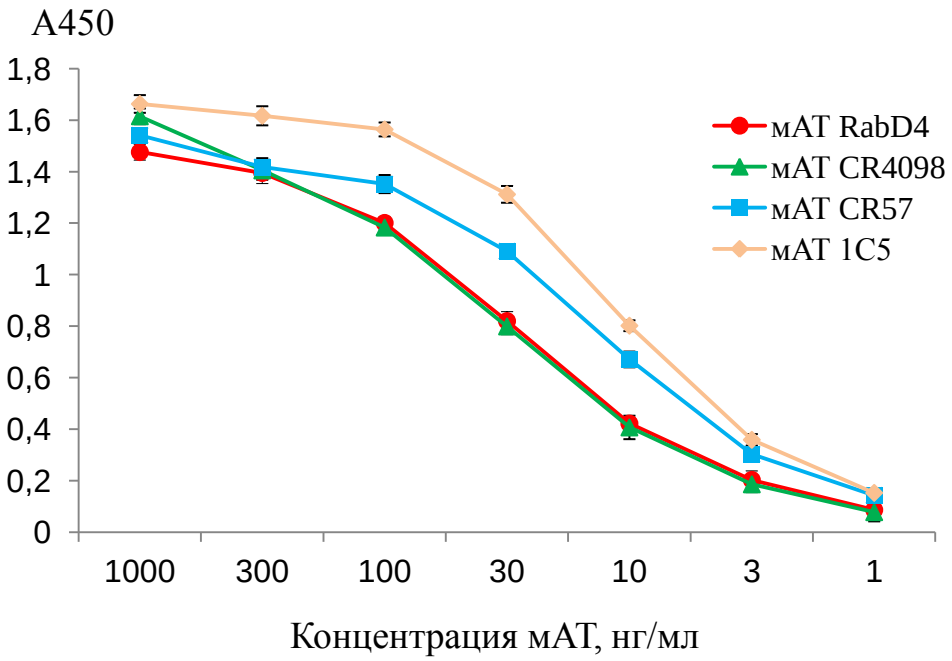

Рисунок 13. Связывание с нативным ГПВБ мАТ 1С5, CR4098, CR57 и RabD4, которое было установлено с помощью непрямого ИФА и выражено как значение оптической плотности, зарегистрированное при длине волны 450 нм. ГПВБ сорбировали на планшет в концентрации 10 мкг/мл

Из представленных данных следует, что полученные мАТ 1С5 и RabD4 обладают высоким сродством к ГПВБ. Для выявления связывания использовали конъюгат поликлональных антител против IgG человека – пероксидаза хрена, что подтверждает также человеческую природу мАТ RabD4 и высокую долю аминокислотных остатков мАТ 1С5, соответствующих человеческим последовательностям, полученных в результате проведения гуманизации.

АФФИННОСТЬ мАТ

Важная характеристика любого антитела – это его аффинность. Несмотря на то, что аффинность и нейтрализующая активность не находятся в прямой зависимости, для осуществления эффективной нейтрализации антитело должно быть еще и высокоаффинным. Константу диссоциации комплекса антиген-антитело полученного

полноразмерного мАТ 1С5 определяли методом конкурентного ИФА по Фриге и др. [Friguet B., 1985]. Для каждого мАТ была полученна кривая связывания в координатах Клотца [Klotz I. M., 1953].

Значения констант диссоциации комплексов мАТ + ГПВБ приведены в таблице 2, где также указаны стандартные отклонения для четырех точек титрования. Для расчетов использовали молекулярную массу нативного ГПВБ, который представлен в виде тримера, – 201 кДа [Gaudin Y., 1992].

Таблица 2. Константы диссоциации мАТ против вируса бешенства по отношению к нативному ГПВБ (“Внуково-32”)

Образец	Кд, М	Стандартное отклонение
мАТ CR57	$5{,}1\times10^{-9}$	$1{,}5\times10^{-9}$
мАТ CR4098	$4{,}3\times10^{-9}$	$9{,}1\times10^{-10}$
мАТ 1С5	$6{,}6\times10^{-9}$	$1{,}3\times10^{-9}$
мАТ RabD4	$2{,}2\times10^{-9}$	3×10^{-10}

Как следует из представленных результатов, полученные гуманизированное мАТ 1С5 и человеческое мАТ RabD4 обладают высоким сродством к ГПВБ.

Из литературных данных известно, что Кд мАТ CR57 и CR4098 составляет $2{,}4\times10^{-9}$ М и $4{,}5\times10^{-9}$ М, соответственно [de Kruif J., 2007], что подтверждает точность данного измерения.

ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ мАТ ПРОТИВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ПО ОТНОШЕНИЮ К РЕКОМБИНАНТНОМУ ГПВБ МЕТОДОМ НЕПРЯМОГО ИФА

Растворимая форма ГПВБ, лишенная его нативных цитоплазматического и трансмембранного доменов, также является антигенной и иммуногенной [Gupta P. K., 2005]. Поэтому для упрощения процесса экспрессии и очистки решено было получить экстрацеллюлярный домен ГПВБ штамм CVS-11.

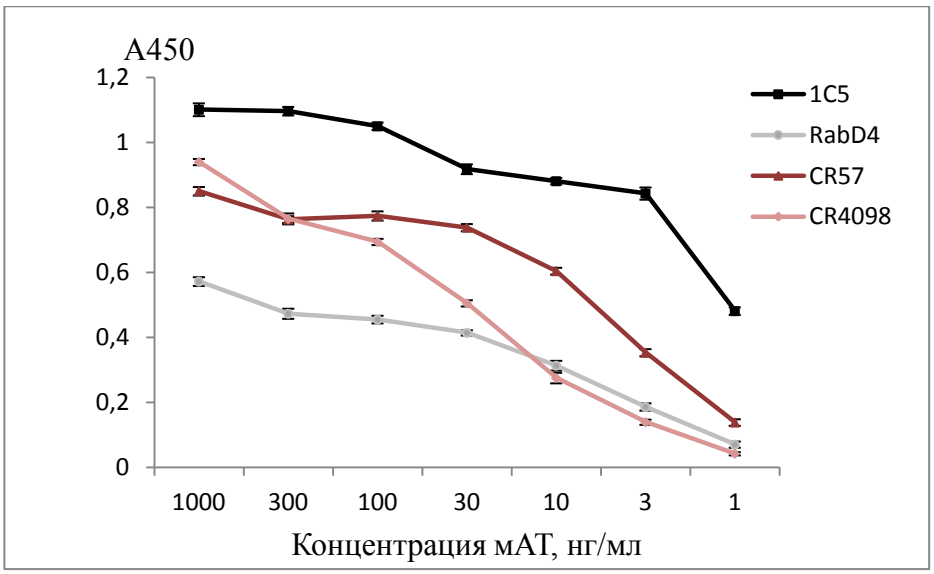

Рисунок 14. Связывание с рекомбинантным ГПВБ мАТ 1С5, CR4098, CR57 и RabD4, установленное с помощью непрямого ИФА и выраженное как значение оптической плотности, зарегистрированное при длине волны 450 нм. ГПВБ сорбировали на планшет в концентрации 1 мкг/мл

Функциональная активность рекомбинантного ГПВБ, а также способность мАТ узнавать ГПВБ в такой форме были изучены в непрямом ИФА. Результаты приведены на рисунке 14.

Из результатов видно, что все мАТ узнают и взаимодействуют с полученным рекомбинантным ГПВБ. При этом рекомбинантный ГПВБ, представляя собой экстрацеллюлярный домен, является мономерным белком, для которого описана возможная концентрационнозависимая олигомеризация. Таким образом, принимая во внимание, что нативный ГПВБ, представляет собой тримерную стабильную молекулу, становится понятно почему характер взаимодействия мАТ с рекомбинантным ГПВБ несколько изменился. Скорее всего это связано со структурными особенностями отдельных АС, которые могут иметь несколько отличающуюся конформацию в случае мономерной или тримерной формы ГПВБ [Sissoeff L., 2005].

ИММУНОБЛОТТИНГ мАТ

Специфичность взаимодействия мАТ 1С5 и RabD4 с целевым антигеном была также подтверждена с помощью иммуноблоттинга с нативным ГПВБ (штамм “Внуково-32”) и вакцинным препаратом “Рабипур”, содержащим инактивированный вирус бешенства (штамм Flury-LEP). Иммобилизованный после электрофоретического разделения в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях на нитроцеллюлозной мембране

нативный ГПВБ или вакцинный препарат инкубировали в растворе с мАТ 1С5, RabD4 или контрольным мАТ CR4098.

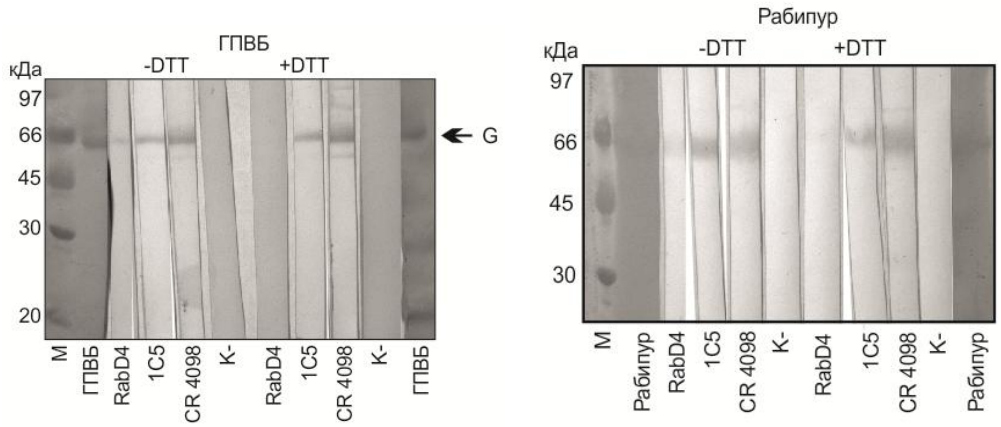

Рисунок 15. Вестерн-блот-анализ связывания мАТ 1С5, RabD4 и CR4098 с высокоочищенным нативным ГПВБ и с вакциной Рабипур (штамм Flury-LEP). Образцы были нанесены в невосстанавливающих условиях (–DTT) без кипячения пробы и в восстанавливающих условиях (+DTT) с кипячением пробы. М– маркеры молекулярных масс, К- – отрицательный контроль

Результаты иммуноблоттинга демонстрируют, что наблюдается связывание обоих антител с белком, мигирирующим в ПААГ на уровне 66 кДа, что соответствует мономерной форме нативного ГПВБ (рисунок 15). При этом на взаимодействие мАТ 1С5 и CR4098 не оказывает влияние присутствие или отсутствие восстанавливающего агента в образцах ГПВБ или Рабипура при проведении ПААГ-SDS. Ослабление или исчезновение взаимодействия мАТ RabD4 с ГПВБ или Рабипуром в тех случаях, когда молекулы антигена были разделены в ПААГ в присутствии DTT, может говорить о том, что данное мАТ узнает конформационный эпитоп, структура которого меняется при восстановлении дисульфидных связей.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ В ИНТРАЦЕРЕБРАЛЬНОМ ТЕСТЕ НА МЫШАХ Balb/c С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ШТАММ CVS-11

В работе была исследована протективная вируснейтрализующая активность мАТ при экспериментальной летальной дозе культурального штамма вируса бешенства CVS-11. Инкубационный период вируса бешенства у мышей при таком способе заражения составляет 4-5 д, поэтому учитывались животные, павшие только после этого срока. Значения вируснейтрализующей активности исследуемых мАТ RabD4 и 1С5, определенные в интрацеребральном тесте, были рассчитаны в сравнении с

международным стандартом, также включенным в эксперимент, и представлены в виде МЕ/мг (Таблицы 3 и 4).

Таблица 3. Результаты реакции нейтрализации штамма CVS-11 вируса бешенства мАТ RabD4 и международным стандартом (МС)

Рабочая доза штамма CVS ($ЛД_{50}$/0,03 мл)	Разведения	Результаты опыта				**Титр препарата**	**Титр международного стандарта**	Специфическая активность испытуемого препарата (МЕ/мг)
		Исп. препарат		МС				
		Выжило	Пало	Выжило	Пало			
397	1:800			6	0	**1:9099**	1:5754	144
	1:1600			6	0			
	1:3200			5	1			
	1:6400			3	3			
	1:12800			0	6			
	1:2000	6	0					
	1:4000	4	2					
	1:8000	2	4					
	1:16000	2	4					
	1:32000	3	3					

Таблица 4. Результаты реакции нейтрализации штамма CVS-11 вируса бешенства мАТ 1C5 и международным стандартом (МС)

Рабочая доза штамма CVS ($ЛД_{50}$/0,03 мл)	Разведения	Результаты опыта				**Титр препарата**	**Титр международного стандарта**	Специфическая активность испытуемого препарата (МЕ/мг)
		Исп. препарат		МС				
		Выжило	Пало	Выжило	Пало			
138	1:800			6	0	**1:41521**	1:5140	418
	1:1600			5	1			
	1:3200			6	0			
	1:6400			3	3			
	1:12800			0	6			
	1:2000	6	0					
	1:6000	5	1					
	1:18000	5	1					
	1:54000	2	4					
	1:162000	2	4					

В каждом эксперименте была определена рабочая доза вируса бешенства CVS-11, которая составила 397 $ЛД_{50}$/0,03 мл в случае тестирования мАТ RabD4 и 138 $ЛД_{50}$/0,03 мл для мАТ 1C5, что соответствует критерию для данной методики. Специфическая

активность, рассчитанная в сравнении с международным стандартом и с учетом концентрации мАТ, составила 144 МЕ/мг для мАТ RabD4 (таблица 3) и 418 МЕ/мг для мАТ 1С5 (таблица 4).

Как показано в таблицах 3 и 4, выживаемость мышей снижалась при разведении мАТ или международного стандарта, т. к. уменьшалась доля мАТ, покрывающих и блокирующих вирусную частицу. Таким образом, с помощью интрацеребального теста была определена защитная способность мАТ, предотвращающая заболевание мышей бешенством.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭПИТОПНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ мАТ 1С5 и RabD4 С ПОМОЩЬЮ КОНКУРЕНТНОГО ИФА

Чтобы определить, с каким АС взаимодействуют мАТ 1С5 и RabD4, был проведен ряд экспериментов с использованием метода ИФА по изучению конкуренции при связывании с ГПВБ экспериментальных образцов и двух референтных мАТ CR57 и CR4098. Ранее [de Kruif J., 2007] было показано, что контрольные мАТ CR57 и CR4098 распознают АС I и АС III ГПВБ, соответственно. Анализируя результаты ИФА, мы предполагали, что если участки связывания двух антител перекрываются, то это будет выражаться в значительной конкуренции за связывание между исследуемыми мАТ 1С5 и RabD4 и референтным антителом.

Для каждой концентрации неконъюгированных антител вычисляли величину B/Bo, где B – значение оптической плотности в лунке с соответствующей концентрацией антитела, Bo – фоновая оптическая плотность, то есть в лунках, не содержащих неконъюгированных антител. Строили графики зависимости B/Bo от концентрации неконъюгированных антител для каждого конъюгата (рисунки 16-18).

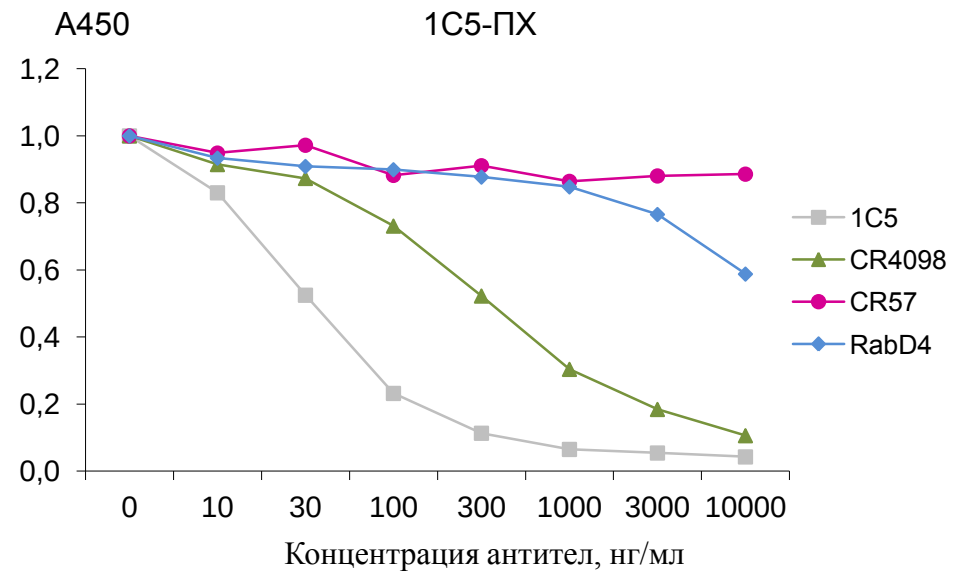

Рисунок 16. Конкурентный ИФА мАТ 1С5, RabD4 CR57, CR4098 с конъюгатом мАТ 1С5 и пероксидазы хрена (1С5-ПХ)

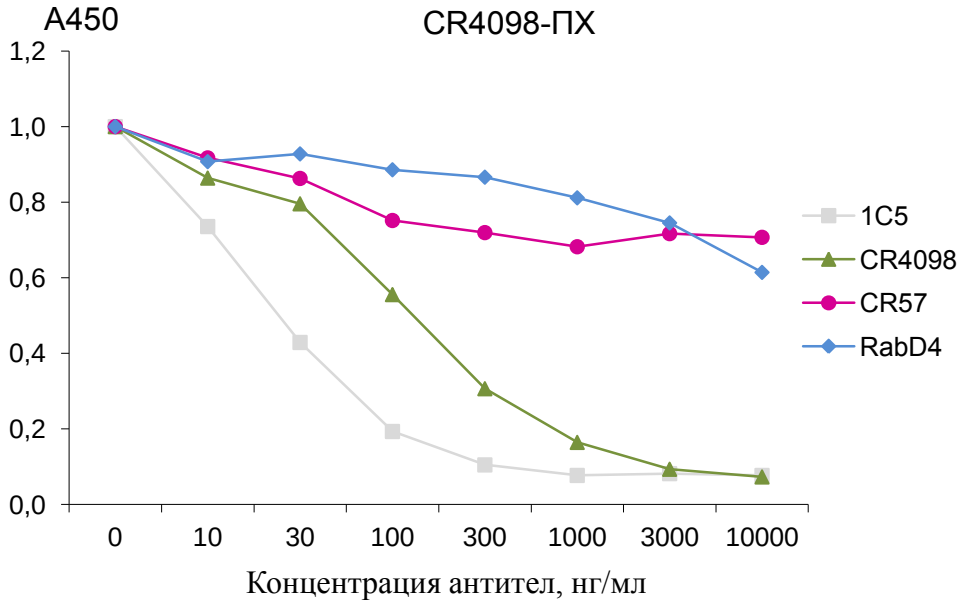

Рисунок 17. Конкурентный ИФА мАТ 1С5, RabD4 CR57, CR4098 с конъюгатом мАТ CR4098 и пероксидазы хрена (CR4098–ПХ)

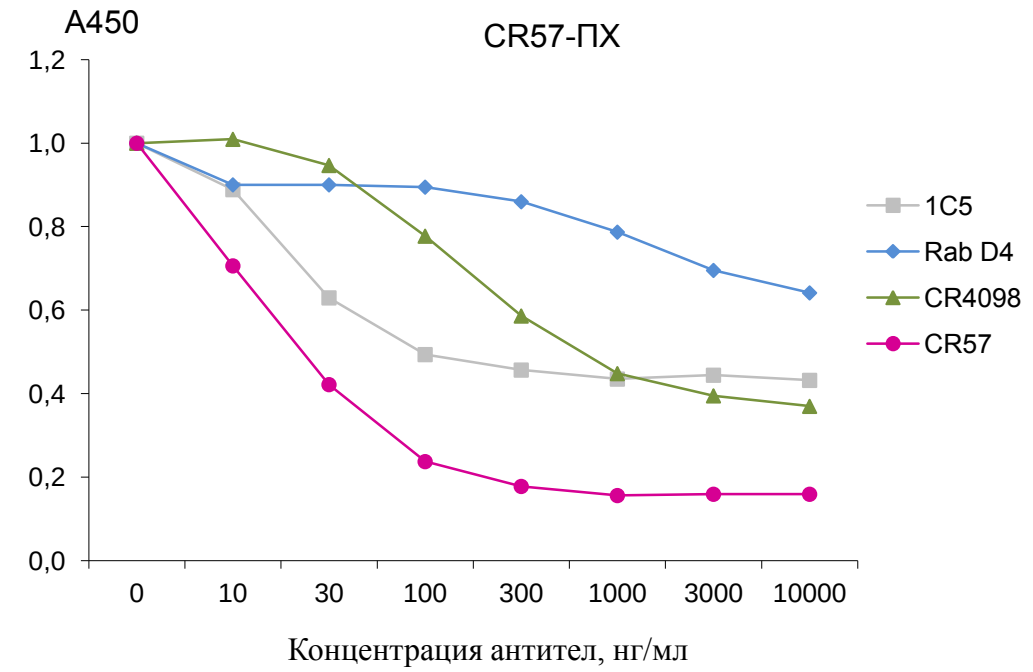

Рисунок 18. Конкурентный ИФА мАТ 1С5, RabD4, CR57, CR4098 с конъюгатом мАТ CR57 и пероксидазы хрена (CR57–ПХ)

Результаты конкурентного ИФА (рисунки 16-18) показывают, что на сигнал связывания мАТ 1С5 с ГПВБ не влияло добавление неконъюгированных мАТ CR57, мАТ RabD4, и наоборот, сигнал значительно падал при добавлении мАТ CR4098. Характер взаимодействия мАТ RabD4 с ГПВБ не изменился при добавлении мАТ CR57, CR4098 и 1С5. Таким образом, было продемонстрировано, что мАТ 1С5 конкурирует с мАТ CR4098, из чего можно сделать вывод о взаимодействии мАТ 1С5 с АС III (рисунок 19). АС III является консервативным и считается второй по значимости антигенной детерминантой вируса бешенства, с которой взаимодействуют нейтрализующие антитела [Lafon M., 1983].

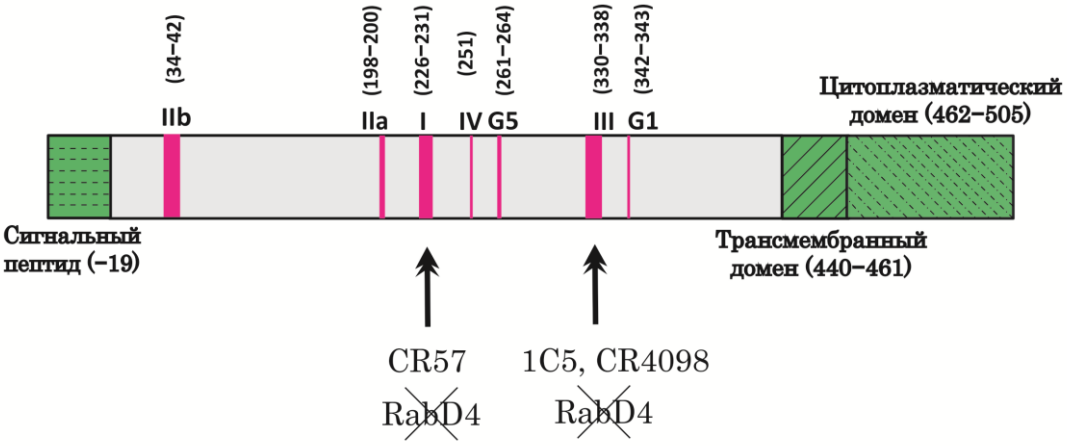

Рисунок 19. Специфичность мАТ по отношению к ГПВБ

При этом было установлено, что мАТ RabD4 не взаимодействует с I и III антигенными сайтами ГПВБ. Таким образом, оно не конкурирует с мАТ 1С5 за связывание с ГПВБ (рисунок 19), и следовательно, может быть использовано в комбинации с мАТ 1С5 для ПЭП бешенства.

Данный факт очень важен, так как два нейтрализующих мАТ, используемых в комбинации, обладают широкой специфичностью и снижают вероятность ускользания от нейтрализации отдельных мутантных вариантов вируса бешенства. При этом важной положительной характеристикой гуманизированного мАТ 1С5 и человеческого мАТ RabD4 является высокая степень сходства с человеческими мАТ, что обеспечивает большую стабильность таких мАТ в организме и усиление эффекторных функций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Терапевтические мАТ уже давно являются важным классом белков для лечения широкого спектра заболеваний: бактериальных, вирусных, аутоиммунных. Ключевой характеристикой антител для профилактики развития бешенства является вируснейтрализующая активность. При этом, учитывая разнообразие штаммов вируса бешенства, применение мАТ для ПЭП должно основываться на комбинировании как минимум двух мАТ различной эпитопной специфичности.

В ходе выполнения работы было осуществлено конструирование полноразмерного мАТ 1С5 (IgG1/к). Были получены гетерогибридомы на основе В-лимфоцитов человека, продуцирующие мАТ к ГПВБ. Было также установлено, что использование родительской гетерогибридомы (гетерогибридомы человек-мышь, утратившей способность к антителопродукции) при слиянии с иммунными человеческими В-лимфоцитами вместо мышиной миеломы значительно увеличивает частоту гибридизации и генетическую устойчивость гибридов. Разработана система детекции, позволяющая с высоким уровнем чувствительности оценивать наличие специфических мАТ к ГПВБ или их способность к взаимодействию с ГПВБ. Были наработаны клетки гетерогибридом 6В2 и RabD4 для выделения генетического материала. Из соответствующих гетерогибридом была выделена РНК, получены молекулы кДНК, осуществлены их секвенирование и анализ.

Оптимизирована система экспрессии рекомбинантных мАТ и получены экспериментальные образцы с чистотой не менее 95%. Подобран вектор pcDNA3.4, подходящий для трансфекции клеток CHO с целью транзиентной экспрессии, и установлено оптимальное соотношение плазмид, кодирующих цепи мАТ, способствующее высокому уровню экспрессии иммуноглобулиновых молекул.

Продемонстрирована высокая технологичность мАТ RabD4 и мАТ 1С5. Данные антитела экспрессируются в большом количестве в гомогенном виде с содержанием мономерной формы (150 кДа) не менее 90-95%, что, по-видимому, обусловлено структурой данных мАТ.

В представленной работе для полученных новых мАТ RabD4 и 1С5 в результате проведения теста FAVN с использованием стандартного штамма вируса бешенства CVS-11 и контрольного образца поликлонального человеческого иммуноглобулина (стандарта ВОЗ) были установлены значения вируснейтрализующей активности – 829,8 МЕ/мг и 1458,72 МЕ/мг, соответственно. Продемонстрирована возможность новых мАТ узнавать ГПВБ разных штаммов (Внуково-32, ERA, CVS-11).

Было выполнено конструирование нуклеотидных последовательностей, кодирующих VL и VH контрольных мАТ CR57 и мАТ CR4098, которые затем были экспрессированы в клетках CHO и использовались в работе в качестве положительных контролей. Был получен рекомбинантный экстрацеллюлярный домен ГПВБ штамм CVS-11 (20-459 а.о.), обладающий антигенными свойствами.

В ходе выполнения работы была также оценена аффинность мАТ 1С5 и мАТ RabD4, значение констант диссоциации антиген-антитело составило не более 10 нМ. Была исследована антигенная специфичность мАТ 1С5 и мАТ RabD4, в результате чего было установлено, что мАТ 1С5 направлено к одному из консервативных эпитопов (АС III), а мАТ RabD4 имеет индивидуальный эпитоп и не конкурирует за связывание с мАТ 1С5.

Протективная активность мАТ 1С5 и мАТ RabD4 была исследована на мышах в тестах *in vivo*. Результаты интрацеребрального теста подтвердили способность вышеуказанных мАТ оказывать вируснейтрализующее действие, тем самым защищая мышей от летальной дозы вирусы.

Таким образом, полученные гуманизированное мАТ 1С5 и человеческое мАТ RabD4, проявляя вируснейтрализующую активность и взаимодействуя с разными антигенными детерминантами ГПВБ, соответствуют первоочередным условиям на роль кандидатов для создания нового препарата для экстренной ПЭП бешенства у людей. Существующие на сегодняшний день поликлональные лошадиные или даже человеческие сыворотки из-за ограниченной доступности, высокой стоимости, иммуногенности и вариабельности от партии к партии по рекомендациям ВОЗ необходимо заменить на стабильный и эффективный препарат на основе нейтрализующих рекомбинантных мАТ.

ВЫВОДЫ

1. Проведено конструирование рекомбинантного полноразмерного гуманизированного мАТ 1С5, для чего были использованы человеческие LC каппа- и HC IgG1- изотипов. мАТ такого строения характеризуются длительным временем полужизни в кровотоке, а также способностью обеспечивать антителозависимую клеточную цитотоксичность и активировать систему комплемента.

2. Использованный метод *in vitro* стимуляции и иммортализации В-лимфоцитов человека позволяет получать полностью человеческие мАТ класса IgG. Был подобран миеломный партнер слияния для создания гетерогибридом на основе иммунных В-лимфоцитов человека. В результате анализа клонов полученных гетерогибридом, были выделены нуклеотидные последовательности, кодирующие новые человеческие мАТ 6В2 и RabD4 к ГПВБ.

3. Методом химико-ферментативного синтеза с использованием попарно-перекрывающихся олигонуклеотидов проведено конструирование референтных мАТ CR57 и CR4098 (Crucell) с известной нуклеотидной последовательностью.

4. Оптимизирован метод транзиентной экспрессии мАТ в клетках CHO, позволяющий повысить уровень экспрессии и уменьшить количество димерных и тримерных форм мАТ. Проведены выделение и очистка трех новых и двух референтных рекомбинантных мАТ к ГПВБ.

5. Методом FAVN показано, что полученные рекомбинантные мАТ 1С5 и RabD4 обладают высокой вируснейтрализующей активностью, сопоставимой с активностью референтных мАТ.

6. Полученные и исследованные рекомбинантные нейтрализующие мАТ 1С5 и мАТ RabD4 характеризуются высокой аффинностью к ГПВБ и направлены к его разным антигенным детерминантам, что позволяет рассматривать данные мАТ в качестве перспективных кандидатов для создания препарата для экстренной ПЭП бешенства у людей.

7. Была подтверждена протективная вируснейтрализующая активность мАТ 1С5 и мАТ RabD4 в интрацеребральном тесте на мышах линии Balb/c с использованием вируса бешенства штамм CVS-11, значения которой составили 144 МЕ/мг и 418 МЕ/мг, соответственно.

Научные статьи по теме диссертации, опубликованные в журналах SCOPUS, WOS, RSCI:

1. **Ильина Е.Н**., Солопова О.Н., Балабашин Д.С., Ларина М.В., Алиев Т.К., Гребенникова Т.В., Лосич М.А., Зайкова О.Н., Свешников П.Г., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Получение и характеризация нейтрализующего моноклонального антитела против вируса бешенства // Биоорганическая химия. – 2019. – Т. 45, №1. – С. 1-11, IF=0,838.
2. **Ильина Е.Н**., Солопова Е.В., Алиев Т.К., Ларина М.В., Балабашин Д.С., Варламов Н.Е., Долгих Д.А., Свешников П.Г., Кирпичников М.П. Получение и характеристика человеческого моноклонального антитела RabD4, специфичного к гликопротеину вируса бешенства // Доклады Академии Наук. – 2019. – Т. 485, №3. С. 108-111, IF=0,613.
3. **Ильина Е.Н**., Ларина М.В., Алиев Т.К., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Рекомбинантные моноклональные антитела для экстренной профилактики бешенства // Биохимия. – 2018. – Т. 83, №1. – С. 3-18, IF=1,886.

Тезисы докладов и материалы конференций

1. **Ilina E**., Solopova O., Varlamov N., Larina M., Aliev T., Sveshnikov P., Dolgikh D., Kirpichnikov M. Generation and characterization of a human neutralizing monoclonal antibody against rabies virus using in vitro immunization method. // FEBS Open Bio. – 2018. V.8, P.07-004-Mon. doi:10.1002/2211-5463.12453.
2. **Ильина Е.Н.** Перспективы создания препарата для экстренной постэкспозиционной профилактики бешенства у людей на основе рекомбинантных моноклональных антител. Международный семинар «Серодиагностика как метод оценки эффективности антирабических мероприятий». Санкт-Петербург, Россия, 28 сентября 2018.
3. Алиев Т.К., Аргентова В.В., Панина А.А., **Ильина Е.Н.,** Ларина М.В., Топорова В.А., Балабашин Д.С., Солопова О.Н., Дементьева И.Г., Позднякова Л.П., Сергеева М.В., Долгих Д.А., Штро А.А., Клотченко С.А., Васин А.В., Свешников П.Г., Кирпичников М.П. Перспективы использования моноклональных антител для профилактики и терапии вирусных заболеваний. Международный Форум "Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни" (BIOTECH WORLD 2018). Москва, Россия, 23-25 мая 2018.
4. **Ильина Е.Н**., Солопова О.Н., Ларина М.В., Алиев Т.К., Варламов Н.Е., Балабашин Д.С., Зайкова О.Н., Лосич М.А., Гребенникова Т.В., Долгих Д.А., Свешников П.Г.,

Кирпичников М.П. Иммунологическая характеристика и исследование вируснейтрализующей активности рекомбинантных антител к гликопротеину вируса бешенства для экстренной постэкспозиционной профилактики. 22-я Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века». Пущино, Россия, 23-27 апреля 2018.

5. Солопова О.Н., **Ильина Е.Н**., Алиев Т.К., Ларина М.В., Свешников П.Г., Кирпичников М.П. Технология получения стабильных продуцентов человеческих антител на примере гибридомы, продуцирующей высокоаффинные нейтрализующие антитела против вируса бешенства. Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды". Москва, Россия, 18-22 сентября 2017.
6. **Ильина Е.Н.** Новое человеческое антитело к гликопротеину вируса бешенства для постэкспозиционной профилактики заболевания. Ильина Е.Н. XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов – 2017". МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, 20 апреля 2017.
7. **Ильина Е.Н**., Солопова О.Н., Алиев Т.К., Ларина М.В., Долгих Д.А., Свешников П.Г., Кирпичников М.П. Получение человеческих антител к гликопротеину вируса бешенства для экстренной профилактики заболевания. XXIX Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Россия, 7-10 февраля 2017.