МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Ильина Екатерина Николаевна

Получение и исследование свойств рекомбинантных антител к гликопротеину вируса бешенства для постэкспозиционной профилактики заболевания

03.01.08 – Биоинженерия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
к. х. н. Алиев Теймур Кантамирович
д. б. н. Долгих Дмитрий Александрович

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 5

ВВЕДЕНИЕ 7

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 13

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ПАТОГЕНЕЗА БЕШЕНСТВА 13

Вирус бешенства. 13

Патогенез бешенства. 14

Уход от распознавания иммунной системой. 18

ПРОФИЛАКТИКА РАЗВИТИЯ БЕШЕНСТВА У ЛЮДЕЙ: ДО И ПОСЛЕ ЗАРАЖЕНИЯ 20

Антирабические вакцины для человека. 20

Постэкспозиционная профилактика. 21

Поликлональные антирабические иммуноглобулины (RIG). 22

мАТ против RABV. 24

ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ мАТ ПРОТИВ RABV 25

Антигенная специфичность мАТ RABV. 25

Способы получения терапевтических мАТ против RABV. 27

Обеспечение эффективной наработки антител. 33

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 38

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 38

Буферные растворы 38

Многокомпонентные растворы: 39

Микробиологические среды 39

Эукариотические среды и реактивы 39

Приготовление полной ростовой среды с ГАТ 40

МЕТОДЫ 40

Синтез генов вариабельных доменов с помощью перекрывающихся праймеров и ПЦР 40

Получение В-лимфоцитов человека, продуцирующих мАТ к ГПВБ 44

Соматическая гибридизация иммунных В-лимфоцитов человека с клетками миеломы 46

Гликопротеин вируса бешенства 48

Выделение РНК 49

Обратная транскрипция и получение специфических нуклеотидных последовательностей, кодирующих целевые белки 50

Амплификация и сборка нуклеотидных последовательностей с помощью ПЦР 51

Электрофорез ДНК в агарозном геле 51

Секвенирование нуклеотидных последовательностей 51

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей 51

Получение генноинженерных конструкций 51

Приготовление химически компетентных клеток 53

Приготовление компетентных клеток для электропорации 53

Получение плазмидных конструкций для транзиентной экспрессии новых рекомбинантных мАТ 6B2, 1C5 и RabD4, а также контрольных мАТ CR57 и CR4098 54

Экспрессия генов 59

Выделение и очистка белков 60

Электрофорез белков в SDS-ПААГ 60

Иммунохимическая характеризация мАТ против ГПВБ 60

Масс-спектрометрический анализ мАТ 63

Определение участка связывания ГПВБ мАТ 1C5 и мАТ RabD4 с помощью конкурентного ИФА 63

Оценка антирабической вируснейтрализующей активности мАТ 63

Определение вируснейтрализующей активности в интрацеребральном тесте на мышах Balb/c с использованием вируса бешенства штамм CVS-11 65

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 69

ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИОННОЙ КОНСТРУКЦИИ, КОДИРУЮЩЕЙ ПОЛНОРАЗМЕРНОЕ ГУМАНИЗИРОВАННОЕ мАТ 1C5 69

ПОЛУЧЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ мАТ К ГПВБ 71

MALDI АНАЛИЗ ДЛЯ мАТ 6B2 И RABD4 75

ПОЛУЧЕНИЕ ПЛАЗМИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ НОВЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ мАТ 6B2, RABD4 И 1C5, А ТАКЖЕ КОНТРОЛЬНЫХ мАТ CR57 И CR4098 76

БИОСИНТЕЗ И ВЫДЕЛЕНИЕ 80

ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ мАТ 85

ПРОВЕРКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ мАТ В НЕПРЯМОМ ИФА 87

АФФИННОСТЬ мАТ 88

ВЫДЕЛЕНИЕ ГПВБ С ПОМОЩЬЮ МЕТАЛЛ-АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ 90

ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ мАТ ПРОТИВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ПО ОТНОШЕНИЮ К РЕКОМБИНАНТНОМУ ГПВБ МЕТОДОМ НЕПРЯМОГО ИФА. 92

ИММУНОБЛОТТИНГ мАТ 93

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ В ИНТРАЦЕРЕБРАЛЬНОМ ТЕСТЕ НА МЫШАХ Balb/c С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ШТАММ CVS-11 94

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭПИТОПНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ мАТ 1C5 и RabD4 С ПОМОЩЬЮ КОНКУРЕНТНОГО ИФА 96

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 100

ВЫВОДЫ 103

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 104

БЛАГОДАРНОСТИ 115

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CDR (complementary determining regions) – гипервариабельные фрагменты антител

CH1-CH2-CH3 – константные домены тяжелой цепи антитела

CHO – клетки яичника китайского хомячка

Cк или Cλ – константный домен легкой цепи антитела

CMV – цитомегаловирус

CVS-11 – штамм вируса бешенства (challenge virus standard)

Fab – антигенсвязывающий фрагмент антитела

FAVN – флюоресцентный вируснейтрализующий тест

FITC – флюоресцеин изотиоцианат

ERIG – антирабический иммуноглобулин лошади (Equine rabies immunoglobulin)

HC – тяжелая цепь иммуноглобулина

HRIG – антирабический иммуноглобулин человека (Human rabies immunoglobulin)

IgG – иммуноглобулин класса G

IL – интерлейкин

LC – легкая цепь иммуноглобулина

NS1 – клетки миеломы мыши

ФСБ – фосфатносолевой буфер

RABV – вирус бешенства

RIG – антирабический иммуноглобулин (Rabies immunoglobulin)

SDS-ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (денатурирующий электрофорез)

VH – вариабельный домен тяжелой цепи антитела

VL – вариабельный домен легкой цепи антитела

а.о. – аминокислотный остаток

АС – антигенный сайт

ГПВБ – гликопротеин вируса бешенства

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТТ – дитиотриэтол

ИФА – иммуноферментный анализ

Кд – константа диссоциации

мАТ – моноклональные антитела

Об/мин – оборотов в минуту

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭП – постэкспозиционная профилактика

РНК – рибонуклеиновая кислота

$ТЦД_{50}$/мл – тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% зараженных клеток монослоя/мл)

ФТС – фетальная телячья сыворотка

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Бешенство – одно из самых опасных зоонотических инфекционных заболеваний, поскольку является летальным для человека в абсолютном большинстве случаев, также не существует надежных прижизненных методов диагностики бешенства во время инкубационного периода. 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. Есть также основания полагать, что данные о количестве летальных случаев в мире 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 [1], [2]. При этом почти все случаи заражения людей RABV связаны с укусами зараженных собак, 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 (в большей степени ERIG, конечно) иммуногенны для человека, что исключает возможность их повторного использования [3], [4], [5].

Помимо огромной социальной значимости, бешенство имеет и серьезное экономическое значение. По данным 2005 г затраты на вакцинацию диких и

сельскохозяйственных животных составили более 15 млн. рублей. На покупку импортного антирабического иммуноглобулина тратится несколько десятков миллионов рублей, а на ликвидацию очагов бешенства – 8-9 млн. рублей [6].

Степень разработанности темы исследования

Необходимость замещения RIG антирабическим рекомбинантным иммуноглобулином неживотного происхождения, являющимся, по меньшей мере, сопоставимым по эффективности и безопасности, остается важным вопросом, решение которого позволит улучшить доступность антирабических биопрепаратов. 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 [7]. На данный момент для клинического применения на территории Индии уже одобрен препарат для ПЭП бешенства у людей на основе одного нейтрализующего человеческого мАТ RABV1 [8]. Данный факт указывает на высокую потребность в такого рода препарате. Другие кандидатные мАТ находятся на разной степени изучения, из которых стоит выделить человеческие мАТ CR57 [9] и мАТ CR4098 (Crucell) [10] и гуманизированные мАТ CTB011 CTB012 [11]. Тем не менее, из-за большого разнообразия штаммов вируса по всему миру, отличающихся между собой точечными мутациями, локализованными, в том числе, в антигенных сайтах, и большому разнообразию эпитопов, продолжает существовать значительная потребность в новых вируснейтрализующих моноклональных антителах человека, имеющих высокий постэкспозиционный профилактический потенциал, в частности антителах, обладающих различной специфичностью распознавания эпитопов.

В отличие от поликлональных RIG препарат мАТ представляет собой гомогенный продукт строгой специфичности, терапевтические свойства которого доказаны, что отражается на быстро растущем объеме мАТ, одобренных для лечения вирусных, аутоиммунных и бактериальных заболеваний [12]. А использование коктейля как минимум из двух мАТ разной специфичности позволит не только расширить спектр его действия, но и предотвратит ускользание от нейтрализации отдельных редких мутантных штаммов вируса бешенства. При этом существует возможность

масштабирования технологии производства мАТ, что позволяет получать почти не ограниченное количество препарата.

Входящие в состав коктейля мАТ должны не уступать RIG по эффективности и соответствовать ряду требований. Во-первых, мАТ должны характеризоваться высокой активностью, приводящей к значительной нейтрализации RABV при использовании ограниченных доз антитела. Во-вторых, коктейль антител должен обладать нейтрализующими свойствами по отношению к широкому спектру природных вариантов RABV. В-третьих, входящие в состав коктейля мАТ должны связываться с отдельными неперекрывающимися эпитопами, что позволит предотвратить избегания нейтрализации отдельными мутантными вариантами вируса. Наконец, в дополнение к эффективности в тестах *in vitro* коктейль мАТ должен обеспечивать защиту от развития инфекции, вызванной RABV, в комбинации с вакциной против бешенства в тестах с использованием релевантной модели *in vivo*.

Доступность коктейля мАТ, не уступающего по эффективности уже используемым для профилактики бешенства антирабическим поликлональным иммуноглобулинам, может привести к более широкому применению пассивной иммунизации в развивающихся странах и, следовательно, снижению числа летальных случаев при заражении RABV людей.

В данной работе были проведены конструирование, экспрессия и анализ гуманизированного мАТ 1C5 и человеческого мАТ RabD4, обладающих высокой вируснейтрализующей активностью против вируса бешенства.

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 и практическая значимость:

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.

Методология и методы диссертационного исследования:

В ходе выполнения диссертационной работы использован комплекс генно-инженерных, молекулярно-биологических, иммунохимических методов исследования, а также работа с культурами клеток.

Положения, выносимые на защиту

1. Проведено конструирование полноразмерного гуманизированного мАТ 1С5, 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 6В2 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 1С5, мАТ 6В2 и мАТ RabD4;
4. Полученные мАТ 1С5 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 1С5 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 1С5 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.

Степень достоверности

Достоверность результатов, представленных в диссертационной работе, определяется репрезентативным объемом проведенных экспериментальных исследований, комплексным применением современных методов исследования и подтверждается статистической обработкой полученных данных.

Апробация результатов

Материалы и результаты диссертационной работы были представлены на 1 всероссийской и 6 международных конференциях. Были опубликованы 3 статьи в журналах, индексируемых Web of Science и Scopus.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ПАТОГЕНЕЗА БЕШЕНСТВА

Вирус бешенства. Заболевание бешенством у людей и животных вызвано оц(–)РНК RABV, принадлежащим к роду Lyssaviruses семейства Rhabdoviridae, относящегося к порядку Mononegavirales V группы по Балтимору [13]. Также известны случаи фатального энцефалита у людей, вызванного другими представителями рода Lyssaviruses [14], которые регистрируются значительно реже. RABV является первым изученным и охарактеризованным из 14 выявленных видов вирусов рода Lyssaviruses [15]. Антигенные и генетические характеристики представителей рода Lyssaviruses позволяют выделить две основные филогруппы: группа I включает – European bat lyssavirus тип I (EBLV-1) и тип II (EBLV-2), Duvenhage virus (DUVV), Australian bat lyssavirus (ABLV), Aravan virus (ARAV), Khujand virus (KHUV), Bokeloh bat lyssavirus (BBLV) и Irkut virus (IRKV); группа II – Lagos bat virus (LBV), Mokola virus (MOKV) и Shimoni bat virus (SHIBV). Оставшиеся вирусы, West Caucasian bat virus (WCBV) и Ikoma lyssavirus (IKOV), не могут быть отнесены ни к какой из этих филогрупп и временно образуют мнимые филогруппы III и IV, соответственно [16], [17], [18]. Экспериментально полученные антитела в мышах против инактивированного вируса из одной филогруппы нейтрализуют вирусы только внутри этой группы. Антитела против West Caucasian bat virus не реагируют ни с одним вирусом из двух основных групп [19]. Эти данные говорят о высоком разнообразии представителей рода Lyssaviruses.

Лиссавирусы имеют пулеобразную или палочкоподобную форму, внутри капсида, который покрыт билипидной мембраной клетки-хозяина, заключен геном в виде несегментированной негативной одноцепочечной РНК. Геномная РНК, имеющая размер 12 тыс. нуклеотидов, кодирует 5 белков: N (нуклеопротеин), P (фосфопротеин), M (матриксный белок), G (гликопротеин) и L (РНК-зависимую РНК-полимеразу). Белки N, P и L вместе с РНК формируют рибонуклеопротеиновый комплекс, который окружен липидной оболочкой, связанной с M и G-белками. Белок G образует тримеры и является основным поверхностным антигеном, с которым связываются нейтрализующие антитела. Вирион вируса включает 500–1600 молекул белка G, что составляет четверть всех белков.

Патогенез бешенства. В связывании лиссавирусов с клеткой принимает участие вирусный гликопротеин, который взаимодействует с рецепторами, обеспечивающими проникновение вируса внутрь клетки путем клатрин-опосредованного эндоцитоза [20]. Гликопротеин RABV представляет собой гомотример, выступающий над поверхностью вириона в виде шипов. Играющий ключевую роль при вирусном заражении G-белок участвует в нескольких этапах жизненного цикла вируса: он позволяет вирусным частицам закрепиться на поверхности клетки-хозяина и, таким образом, определяет клеточный тропизм [21]. После связывания с рецептором вирус попадает в клетку посредством эндоцитоза. Кислая среда эндосом индуцирует конформационные изменения в молекулах белка G, что приводит к слиянию вирусной оболочки и клеточной мембраны и высвобождению нуклеокапсида вируса в цитоплазму. После цикла репродукции в клетке вирус покидает ее, отпочковываясь, что также происходит при участии G-белка. Кроме того, гликопротеин играет важную роль в индукции иммунного ответа организма-хозяина, индуцирует синтез специфических нейтрализующих антител [22] и стимулирует цитотоксическую активность Т-лимфоцитов [23].

Зрелая молекула гликопротеина состоит из 505 а.о. В молекуле G-белка выделяют три домена: эктодомен (1–439 а.о.), трансмембранный домен (440–461 а.о.) и цитоплазматический домен (462–505 а.о.). Для этого гликопротеина предсказано три потенциальных сайта N-гликозилирования (Asn37, Asn247, Asn319), из которых бывают гликозилированы только один или два, причем уровень гликозилирования первого наименьший [24]. Еще одной посттрансляционной модификацией гликопротеина G является присоединение остатков жирной кислоты – пальмитоилирование, которое осуществляется по Cys460 [25].

Антигенная структура гликопротеина RABV была установлена с использованием панелей мАТ. (Вся нумерация аминокислотных остатков указана для зрелого белка, после удаления сигнального пептида.) Антигенный сайт (АС) I включает в себя как конформационный, так и линейный эпитопы и представлен 226–231 а.о. [26]. АС II представляет собой конформационный эпитоп, включающий 34–42 (IIb) и 198–200 (IIa) а.о. [27]. АС III – также конформационный эпитоп, содержащий 330–338 а.о.. АС IV включает в себя один а.о. в позиции 251. Минорный сайт а, также именуемый G1

локализован в позиции 342–343. AC G5 – линейный эпитоп, включающий 261–264 а.о., в состав которого также входит антигенный сайт VI, описанный ранее как сайт, представленный только одним а.о. в позиции 264 [28]. Расположение антигенных сайтов гликопротеина RABV показано на рисунке 1 .

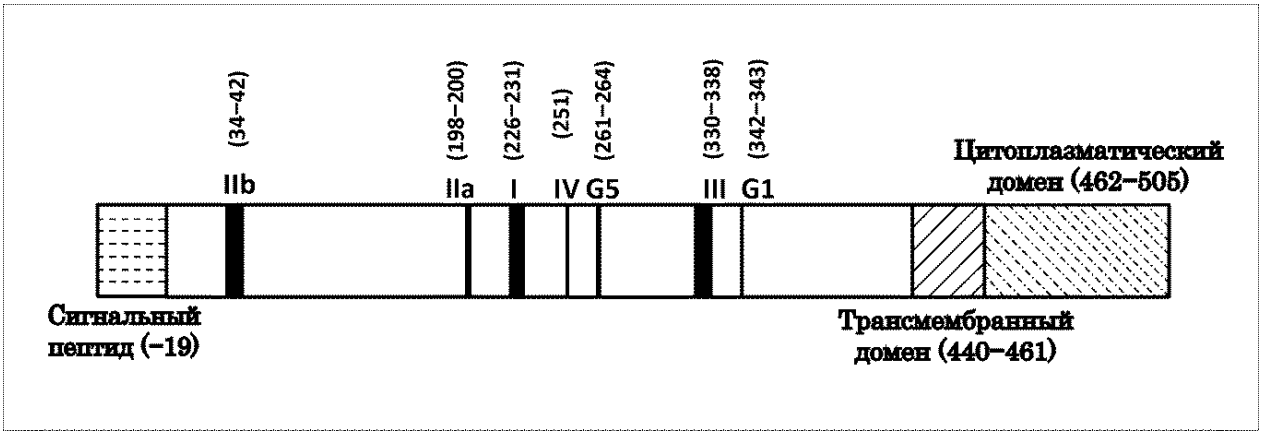

Рисунок 1. Антигенные сайты гликопротеина RABV. Цифрами обозначены номера а.о. Схематический рисунок, показывающий нумерацию а.о и относительное расположение антигенных сайтов (I, IIa, IIb, III, IV, G1 и G5) в пределах внеклеточного домена G. Нумерация соответствует зрелому пептиду, т.е. не включающего в свой состав первые 19 а.о., относящихся к сигнальному пептиду

In vitro лиссавирусы способны заражать широкий спектр клеточных линий, хотя механизмы проникновения в различные клетки пока не ясны. Предполагается, что углеводные фрагменты, фосфолипиды и сиалированные ганглиозиды могут выступать в качестве потенциальных участков связывания и внедрения вируса в клетку [29].

RABV – это патоген, хорошо адаптированный к нервной системе млекопитающих, поражающий, главным образом, нейроны. В результате укуса и мышечного заражения вирусные частицы из слюны инфицированного животного попадают в нервную систему через чувствительные нервы или нервно-мышечные соединения, где моторный аксон, разделяясь на несколько терминалей, соприкасается с мышечным волокном. От периферических нервных окончаний вирус перемещается к спинному мозгу, откуда затем проникает в головной мозг. Только после активной амплификации в головном мозге вирус перемещается в лимфу или слюнные железы для последующего распространения. Зрелые вирионы попадают в слюну и передаются другим животным через укусы.

Размножение вируса начинается во время инкубационного периода, продолжительность которого может варьировать от нескольких недель до нескольких лет, но, в среднем, составляет 1–2 месяца. Большую часть инкубационного периода вирусные частицы остаются в мышцах или начинают медленно реплицироваться, оставаясь при этом в месте укуса. В результате локального заражения развития иммунного ответа в организме хозяина не происходит. Дендритные клетки, играющие ключевую роль в индукции как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа, не активируются вирусом в достаточной степени. Длительный инкубационный период, вероятно, обусловлен низким титром вирусных частиц в тканях, а также наличием эндогенных микроРНК, которые замедляют вирусную репликацию в мышцах. Предполагается, что микроРНК mir-133, специфичные для мышечных клеток, связываются с РНК, кодирующей нуклеопротеин и гликопротеин RABV, препятствуя в значительной степени экспрессии вирусных белков, что было подтверждено в экспериментах с трансформированными рабдавирусом клетками Neuro-2a [30]. Однако, как было показано в экспериментах на мышах и приматах, находясь в большой концентрации, RABV способен заражать двигательные концевые пластинки без предварительной репликации в мышцах [31]. Более того, при попадании напрямую в нервную ткань в высоком титре, вирус может заражать двигательные нейроны без предварительной репликации [32]. Это открытие позволяет объяснить крайне короткий инкубационный период у людей, инфицированных RABV в случае проникающего ранения нерва.

Литературные данные указывают на то, что RABV попадает в двигательные нейроны именно через нервно-мышечные соединения [33]. В качестве клеточных рецепторов он использует мембранные молекулы и механизмы, участвующие в транспорте факторов роста, гормонов, питательных веществ и других жизненно важных молекул внутрь клетки. Для RABV сейчас установлено три типа рецепторов, с которыми он специфически связывается или которые способствуют проникновению вируса в клетку. Это никотиновый ацетилхолиновый рецептор (н-холинорецептор, нАХР), молекулы нейрональной клеточной адгезии (NCAM) и рецептор фактора роста нервов, часто именуемый рецептором нейротрофинов p75 (NGFR или p75NTR) (рисунок 2).

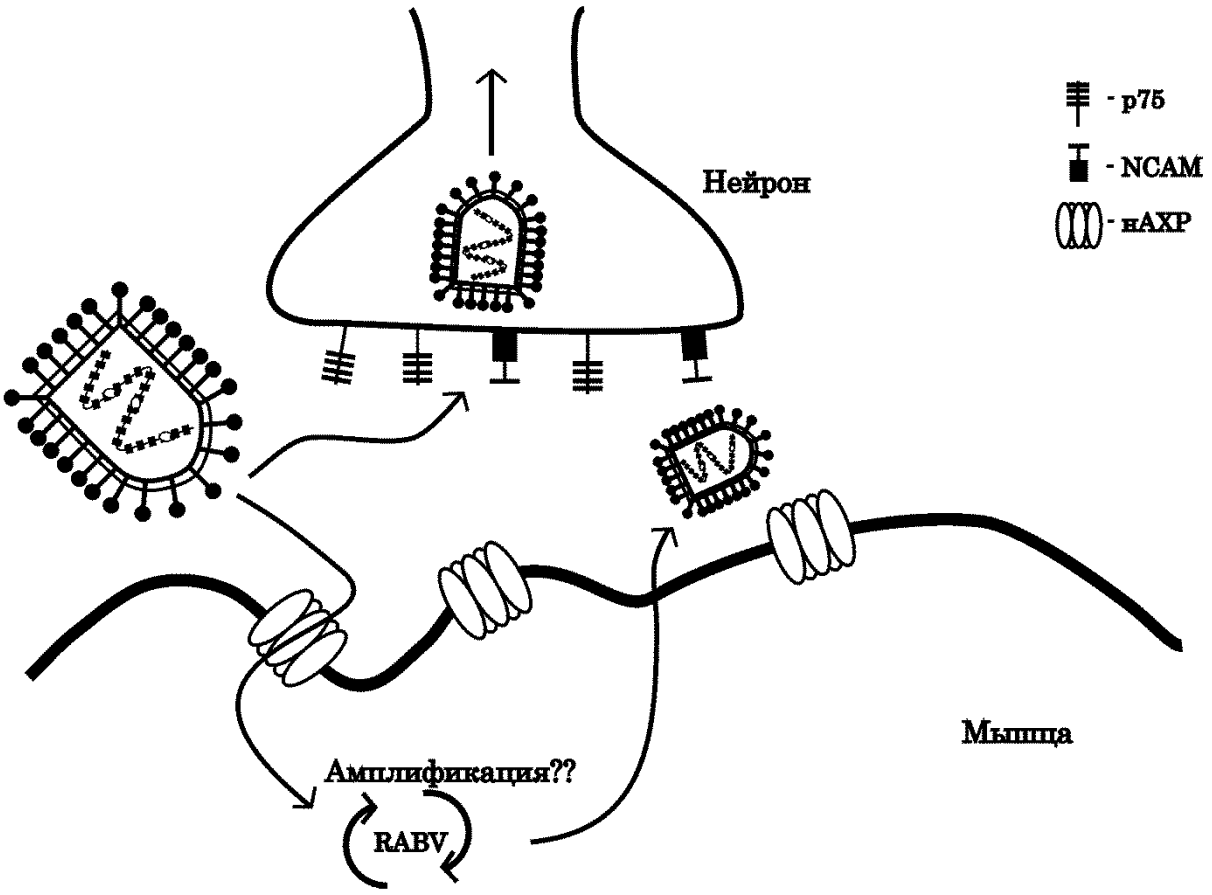

Рисунок 2. Механизмы проникновения RABV в нейроны

В области нервно-мышечного соединения свободные вирусные частицы связываются с нАХР, локализованными в синаптической щели на поверхности постсинаптической мембраны. При этом происходит увеличение концентрации RABV на поверхности мембраны, что повышает вероятность захвата вирусной частицы нервным окончанием [33]. В нервной системе присутствует несколько типов нАХР, но только одна форма, содержащая продукт α1-гена, экспрессируется в мышцах, на постсинаптической мембране. Основным сайтом связывания белка G служит фрагмент α-субъединицы нАХР между 173 и 204 а.о. [34].

Последующее перемещение RABV к пресинаптической мембране ассоциируют с молекулами NCAM, сконцентрированными в синапсах на мембране нейронов и в нервно-мышечных соединениях. Молекулы NCAM вовлечены в перемещение и круговорот синаптических везикул. Присутствие этих молекул вместе с ганглиозидами в составе липидных рафтов приводит к связыванию гликопротеина с NCAM,

отсоединению частиц вируса от нАХР и перемещению вирионов к нервному окончанию.

В клетку частицы RABV проникают, находясь внутри везикул, с мембраной которых может слиться их оболочка, в результате чего происходит высвобождение нуклеокапсида. При альтернативном способе распространения частицы вируса остаются в везикулах и транспортируются к соме нейронов, где может происходить репликация. Гликопротеин RABV может связываться с рецепторами фактора роста нервов p75NTR [35], в результате чего вирусные частицы перемещаются вдоль аксона с помощью механизма ретроградного транспорта через спинной мозг к головному мозгу. До этой стадии обычно не наблюдается никаких клинических признаков инфекции.

Другие компоненты клеточной мембраны также вовлечены в процесс транспорта вируса внутрь клеток. Фосфолипиды, гликолипиды, сиаловые кислоты и углеводы предположительно участвуют в проникновении RABV в клетку. Есть данные свидетельствующие о том, что сильно сиалированные ганглиозиды, которые являются важной составляющей пресинаптической мембраны, также опосредуют проникновение вируса в клетки [36]. Тем не менее, еще не доказано, что RABV непосредственно связывается с ганглиозидами.

Уход от распознавания иммунной системой. Справиться с RABV иммунная система человека и других млекопитающих без активной терапии не способна. Вирус выработал несколько способов ухода от распознавания, как врожденным иммунитетом, так и адаптивным. Основной механизм формирования внутриклеточного ответа на вирусную инфекцию реализуется через два класса врожденных сенсоров – хеликазы RIG-1 (DDX58) и MDA5 (IFIHI) [37], а также трансмембранные Toll-подобные рецепторы 3 и 7/8 (Toll-like receptors, TLRs) [38]. TLR3 узнает экзогенные или эндогенные двухцепочечные или одноцепочечные молекулы РНК, находясь на внешней плазматической мембране клетки и мембране эндосом. Таким образом, зараженные нейроны и клетки нейроглии способны индуцировать иммунный ответ, используя противовирусные механизмы врожденного иммунитета, а именно интерфероны (ИФН) I типа (α и β), а также провоспалительные цитокины, хемокины. Интерфероны, активируя интерферон-стимулируемые гены, через сложный каскад событий в конечном итоге приводят к деградации РНК, как вирусной, так и клеточной. Такие события могут

вызвать гибель клетки, что является дополнительной защитой по отношению ко всему организму. Однако было показано, что вирус использует TLR3 в своих целях, подавляя синтез интерферонов. После попадания в тело нейрона с помощью эндоцитоза начинается репликация и транскрипция вируса. В результате в цитоплазме клеток образуются включения, называемые тельцами Негри (Negri bodies, NBs), которые ранее считались местами скопления избыточного количества вирусных белков [39]. Однако в результате более поздних исследований было установлено, что NBs – это сайты вирусной транскрипции и репликации [39]. При этом основным белком, участвующим в формировании NBs, помимо содержащихся в них вирусных белков N, P и вирусной РНК, является TLR3 [40]. Накопление TLR3 в вирусных агрегатах в цитоплазме уменьшает активацию сенсоров врожденного иммунитета и выработку интерферонов. В то же время фосфопротеин RABV блокирует выработку ИФН I типа путем угнетения транскрипции генов ИФН-α и ИФН-β, препятствуя фосфорилированию IRF3- и IRF7-киназами ТВК1 и IKK-i. Также ингибируется сигнальный путь STAT (STAT 1 и STAT 2), через который ИФН I типа реализуют свою противовирусную активность [41]. Таким образом, воспалительный процесс в ЦНС, куда проникли вирусные частицы, в значительной степени подавляется, позволяя вирусу распространяться в организме человека с большей скоростью.

Угнетение адаптивного иммунного ответа связано с апоптозом Т-клеток и моноцитов, которые проникли через гематоэнцефалический барьер для борьбы с вирусом непосредственно в нервной ткани. RABV использует для своих целей способность Т-клеток контролировать свою активацию через ингибирующую стимуляцию или апоптоз, что в норме регулирует их толерантность и ослабляет иммунный ответ. Нейроны, зараженные вирусом, экспрессируют на своей поверхности повышенное количество ингибиторных молекул, которые, взаимодействуя с соответствующими рецепторами Т-клеток, подавляют их пролиферацию и продукцию цитокинов, или вызывают апоптоз этой субпопуляции. С целью подавления эффекторных иммунных реакций хозяина, RABV использует PD-1/B7-H1, CD8/HLA-G и Fas/FasL-опосредованные пути индукции апоптоза Т-клеток [42]. Уход от распознавания системой врожденного иммунитета и подавление адаптивного иммунного ответа можно рассматривать как успешную адаптацию RABV к организму хозяина.

ПРОФИЛАКТИКА РАЗВИТИЯ БЕШЕНСТВА У ЛЮДЕЙ: ДО И ПОСЛЕ ЗАРАЖЕНИЯ

Единственным способом предотвращения развития заболевания в настоящее время является пред- и постэкспозиционная (ПЭП) профилактика. Предэкспозиционная профилактика включает в себя заблаговременную вакцинацию, которая необходима при повышенном риске заражения. ПЭП проводится сразу же после контакта с животными, подозреваемыми на бешенство. Данный способ профилактики представлен на сегодня поликлональными сыворотками и вакцинами, комбинирование которых необходимо для эффективного подавления развития и уничтожения вирусных частиц, попавших в организм.

Антирабические вакцины для человека. Целью вакцинации является индукция образования специфических вируснейтрализующих антител. Являясь высокоэффективной стратегией в предотвращении развития заболевания, вакцинация выполняется как в рамках предэкспозиционной профилактики, так и ПЭП. Преимущества профилактической иммунизации заключаются в том, что уменьшается доза вакцины, необходимой в рамках ПЭП, в случае реального заражения, и, зачастую, не требуется пассивная иммунотерапия с использованием RIG.

Первые вакцины против бешенства были получены на основе неочищенных препаратов нейрональных тканей животных и являлись слабо иммуногенными, в связи с чем требовалось введение нескольких доз для индукции иммунитета. При этом в таких вакцинах могли присутствовать частицы жизнеспособного вируса, что вызывало осложнения после иммунизации. В 1940-х гг. они были заменены на более иммуногенные и безопасные вакцины, полученные в клеточных культурах (cell-culture-derived vaccines, CCVs) [43]. Несмотря на официальные рекомендации прекратить использование вакцин из нервных тканей, в некоторых странах они применяются в настоящее время.

Крупномасштабное получение инактивированной вакцины из клеточных культур в 1960 г. позволило ограничить распространение RABV [43]. Впервые вакцина против бешенства стала широкодоступна для использования в рамках профилактики заболевания человека до момента укуса, а не только после заражения. В течение двух

последних десятилетий продолжается разработка вакцин нового поколения, как для человека, так и для животных. Эти исследования привели к производству рекомбинантных вакцин против бешенства, которые содержат синтезируемый биотехнологическим способом антиген. Рекомбинантный антиген для вакцины получают путем клонирования гена гликопротеина RABV (штамм ERA) в бактериальные или вирусные векторы [44] и экспрессии в соответствующих гетерологичных системах. Необходимо отметить, что вакцины на основе рекомбинантных антигенов являются более безопасными для человека, т.к. не содержат вирусных частиц. Недавно были представлены прототипы рекомбинантных вакцин растительного происхождения, которые были получены с использованием вирусных векторов растений (таких, как вирус табачной мозаики, ВТМ) [45]. Производственные системы на основе растений недороги, безопасны и просты в использовании. Также разрабатываются экспериментальные ДНК-вакцины: ген, кодирующий иммуногенный белок, встраивают в вектор, обеспечивающий его экспрессию, но не способный к самостоятельной репликации в организме хозяина. Продукты экспрессии данных генов способны вызывать формирование иммунитета, сохраняясь в организме до 3–4 недель [46]. Такие вакцины пока не нашли широкого применения в клинической практике, т.к. для их использования требуется проведение различных исследований, подтверждающих их безопасность и эффективность. Стоит отметить, что столь интенсивное развитие данного направления в разработке вакцин уже в ближайшей перспективе, вероятно, приведет к созданию новых еще более эффективных и безопасных вакцинных препаратов, рекомендованных для применения в медицине и ветеринарии. На сегодняшний день по указаниям ВОЗ существует ряд штаммов вируса бешенства, которые надлежит использовать при изготовлении вакцин: CVS, Flury Lep, Flury Hep, ERA, Внуково-32, Парижский штамм Пастера [47].

Постэкспозиционная профилактика. Бешенство – одно из немногих инфекционных заболеваний, развитие которого может быть предотвращено после проникновения вируса в организм с помощью мер ПЭП. Ключевым моментом в эффективности применения ПЭП является время, в течение которого будут предприняты эти действия.

Каждый год более 20 млн людей по всему миру получают ПЭП, которая предотвращает сотни тысяч смертей. ПЭП включает в себя безотлагательную обработку всех ран от укусов и царапин с помощью промывания и дезинфекции, введение RIG и полный курс вакцинации. Когда ПЭП выполняется в соответствии с нормами, RABV может быть удален из организма до начала репродукции вирусных частиц в тканях ЦНС.

Экстренная ПЭП представляет собой высокоэффективный подход, который сочетает как активную, так и пассивную иммунизации. Целью пассивной иммунизации с использованием RIG является создание кратковременного иммунитета, препятствующего репликации вируса в период времени, необходимый для развития иммунного ответа и появления в организме человека нейтрализующих антител после вакцинации. Комбинация антирабической вакцины и RIG обладает почти 100%-ной эффективностью в предотвращении развития заболевания. К сожалению, использование вакцины или RIG после появления симптомов бешенства неэффективно и летальный исход практически неизбежен [48].

Поликлональные антирабические иммуноглобулины (RIG). RIG используется для ПЭП бешенства у людей с середины XX века. К преимуществам поликлональных иммуноглобулинов относятся их высокая эффективность, широкий спектр вируснейтрализующей активности, полиспецифичность, а также в случае использования HRIG и эффекторные функции. Наиболее важной особенностью RIG является способность взаимодействовать с несколькими антигенными эпитопами (полиспецифичность), которая препятствует отбору мутантных вариантов вируса, ускользающих от нейтрализующего действия антител.

Как правило, процесс производства RIG включает в себя очистку иммуноглобулинов класса G (IgG) из плазмы иммунных людей или животных (как правило, лошадей). HRIG и ERIG в настоящее время применяются для ПЭП бешенства у людей. ERIG, использующийся преимущественно в развивающихся странах, характеризуется достаточно высокой иммуногенностью для человека. Введение ERIG вызывает образование антилошадиных антител, что, в свою очередь, приводит к быстрому выведению ERIG из организма человека. Короткое время циркуляции ERIG требует использования больших дозировок, что может приводить к развитию реакции

гиперчувствительности III типа, приводящей иногда к летальному исходу. Из-за нежелательных реакций врачи нередко опасаются использовать ERIG, что противоречит нормативам полной ПЭП и может привести к неэффективной профилактике бешенства с летальным исходом. Побочные эффекты терапии с использованием иммуноглобулинов лошади в основном связаны с Fc-доменом антител и, следовательно, ERIG, лишенный этой области, т.е. $F(ab')_2$, который получают пепсинолизом IgG, является более безопасным препаратом, который наряду с полноразмерными иммуноглобулинами применяется в настоящее время [49]. Помимо высокой иммуногенности ERIG представляет еще и некоторую инфекционную опасность для человека, в связи с чем требуется качественная очистка. С целью предотвращения негативных последствий перед введением лошадиной сыворотки выполняется проведение кожных проб с разведенной сывороткой, кроме того проводится премедикация с антигистаминными и кортикостероидными препаратами.

Поиски альтернативы сывороточным продуктам животного происхождения привели к получению HRIG, которые являются функциональными аналогами ERIG. Современные HRIG безопасны, неиммуногенны и хорошо переносятся людьми. Известно крайне мало случаев анафилактической или сывороточной болезни. Однако, поскольку HRIG выделяют из плазмы человека, то имеется потенциальная опасность передачи инфекционных агентов, переносимых с кровью, которая может быть снижена путем обработки сыворотки детергентами или термическим способом. Система контроля, состоящая из скрининга и тестирования доноров, соблюдения принципов GMP на производстве, специфического процесса вирусной инактивации значительно снижает степень риска. Такие процессы являются дорогостоящими и обычно не доступны в развивающихся странах, где зарегистрированы 90% случаев заражения RABV [50], [51].

Вне зависимости от происхождения, поликлональные RIG, в целом, имеют определенные недостатки, среди которых необходимость привлечения доноров и проведение их иммунизации; этические проблемы; более низкая специфическая активность, вынуждающая использовать большее количество белка, что может привести к побочным эффектам; вариабельность препарата от партии к партии; потенциальный риск передачи инфекционных агентов. Исходя из соображений медицинской

безопасности и увеличения доступности препарата в развивающихся странах, замена HRIG и ERIG на альтернативные продукты представляется необходимой, что следует также из рекомендаций ВОЗ [52].

мАТ против RABV. Использование мАТ для терапии, в т.ч. вирусных заболеваний, предполагает ряд преимуществ по сравнению с поликлональными аналогами: мАТ характеризуются большей удельной активностью, т.к. все молекулы иммуноглобулина, содержащегося в препарате, специфичны по отношению к выбранной мишени. Благодаря этому нет необходимости использовать большое количество белка, что также ведет за собой снижение объема инъекции, позволяющее избегать развития неблагоприятных реакций. Стандартизованное производство с использованием клеточных продуцентов обеспечивает однородность препаратов мАТ от партии к партии. Существуют и некоторые недостатки при использовании мАТ, которые, однако, не оказывают заметного влияния на перспективы применения антител для терапии инфекционных заболеваний. Производство мАТ является достаточно дорогим. При этом, несмотря на высокую специфичность мАТ, патогенные организмы, обладающие способностью к быстрой смене антигенных вариантов, создают значительные препятствия для разработки нейтрализующих антител широкого спектра. Поскольку мАТ связывается с единственным эпитопом, в природе могут отбираться варианты патогенных вирусов, которые избегают нейтрализации в результате возникновения мутаций или микроэволюционных процессов.

Препарат иммуноглобулина для экстренной ПЭП бешенства на основе мАТ должен соответствовать ряду критериев. Во-первых, антитела должны обладать нейтрализующей активностью по отношению к вариантам RABV, которые наиболее широко представлены в регионе, где планируется использование данных терапевтических антител. Во-вторых, данный препарат должен включать в себя, по меньшей мере, два разных антитела, которые связываются с неперекрывающимися и неконкурирующими эпитопами. Таким образом, вирусы, содержащие мутации, дающие им возможность избежать связывания с одним из антител, могут быть нейтрализованы другим антителом [53]. В-третьих, антитела должны быть неиммуногенными для человека. В-четвертых, такой препарат должен быть сопоставимым по эффективности с существующими препаратами HRIG [53]. Также стоимость производства

антирабических антител должна быть приемлемой, что сделает их доступными для профилактики развития бешенства для всех пациентов, нуждающихся в ПЭП, в т.ч. в развивающихся странах, где количество летальных случаев наиболее велико.

Подробное описание некоторых полноразмерных антител, предложенных в качестве кандидатов для замены RIG в рамках ПЭП бешенства у людей, приведено в следующих разделах настоящего обзора.

ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ мАТ ПРОТИВ RABV

Антигенная специфичность мАТ RABV. Гликопротеин представляет собой единственный антиген RABV, который индуцирует образование нейтрализующих вирус антител [22], [54]. Механизмы нейтрализации с помощью антител были предложены для различных вирусов. Самым простым из предполагаемых механизмов нейтрализации является препятствование прикреплению вируса к клетке в результате блокирования всех молекул гликопротеина вириона. Другой возможный механизм основан на способности антител вызывать конформационные изменения G-белка, приводящие к потере способности вириона связываться с клеточными рецепторами, которая необходима для проникновения вируса в клетку и его дальнейшего размножения. Также вируснейтрализующие антитела могут оказывать свое защитное действие путем удаления патогена с помощью комплемент-опосредованного лизиса инфицированных вирусом клеток и антителозависимой цитотоксичности.

Пока что не для всех описанных мАТ к гликопротеину RABV достаточно полно изучены и охарактеризованы иммунохимические свойства. В данном обзоре рассматриваются описанные в литературе антитела, для которых подтверждена нейтрализующая активность по отношению к RABV.

Для большинства антител к RABV были установлены сайты связывания с гликопротеином (I, IIa, IIb, III, IV, G5, VI и минорный сайт a). На данный момент получены нейтрализующие антитела, связывающиеся с пятью из восьми известных АС гликопротеина RABV. В литературе до настоящего момента не были описаны мАТ-кандидаты для клинических исследований, связывающиеся с минорным сайтом a,

который иначе называется G1 (342–343 а.о.), а также с АС IV (251 а.о.) и АС VI (264 а.о.).

С АС I, включающим 226–231 а.о., взаимодействует антитело человека CR57 (Crucell) [9], химерное антитело 62-71-3 [55] и антитело человека RVC-20 [56]. С АС II связывается химерное антитело E559 (АС IIb – 34–42 а.о.) [57] и антитело человека No.254 (АС IIa – 198–200 а.о.) [58]. К АС III (330–338 а.о.) получены несколько антител человека: CR4098 (Crucell) [10], RABV1 [8] и RVC-58 [56] и гуманизированное CTB011 [11]. С IV сайтом, называемым также G5, (261–264 а.о.) взаимодействует антитело человека AR16 [59]. Существует еще одно антитело человека 4D4, которое связывается с предполагаемым новым эпитопом гликопротеина, который расположен между I и VI антигенными сайтами и включает а.о. в позиции 242 [58].

Антигенные характеристики гликопротеина изучают на мутантных вариантах RABV, устойчивых к нейтрализации теми или другими мАТ, т.е. оценивают частоту замен определенных а.о., входящих в антигенный сайт, а также влияние замен на нейтрализующую активность мАТ, которое ранее проявляло эту способность. Так, наибольшее число полученных нейтрализующих мАТ к RABV связываются с АС II или III [28].

Основным АС G-белка, который узнают 70% перспективных мАТ, является АС II. Второй по значимости – АС III, с которым взаимодействует ~20% антител к гликопротеину RABV [60], [61]. Также стоит выделить АС I и минорный сайт а, все остальные сайты считаются второстепенными. Важность того или иного АС для эффективной нейтрализации терапевтическими антителами широкого спектра вариантов RABV связана с его консервативностью. Наиболее консервативными можно назвать сайты I, II и III. Каждый АС характеризуется различным уровнем вариабельности а.о. В АС I аминокислотная позиция 231 является наиболее вариабельной, для сайта II наибольшая вариабельность отмечена для 36, 37 и 199-й а.о., сайт III также содержит несколько вариабельных позиций – 332, 333, 336, 338 а.о. [56], [62]. Таким образом, наиболее предпочтительны для терапевтического использования те антитела, на специфическое связывание которых перечисленные выше вариабельные а.о. оказывают минимальное влияние.

Универсальное мАТ, которое могло бы нейтрализовать все известные варианты RABV, пока представляется недостижимой целью. Отсутствие такого антитела связано с большим разнообразием штаммов вируса по всему миру, отличающихся между собой точечными мутациями, локализованными, в т.ч. в антигенных сайтах, что приводит к большому разнообразию эпитопов. Таким образом, применение мАТ для ПЭП должно основываться на комбинировании различных антител, что позволит нейтрализовать большинство или все известные штаммы.

Способы получения терапевтических мАТ против RABV. В 1975 г., благодаря работе Келера и Мильштейна [63], было положено начало получения мАТ с помощью гибридомной технологии, благодаря чему идея о таргетной терапии начала обретать практические очертания. Гибридомная технология позволила получать в ответ на иммунизацию антигеном не набор разнообразных иммуноглобулиновых молекул, а антитело, направленное против одного специфического антигена, т.е. мАТ.

К сожалению, первое поколение мАТ, полученных в результате иммунизации мышей, имело тот же главный недостаток, что и ERIG, – сильную иммуногенность для человека. Наличие ряда других ограничений, таких как нестабильность некоторых мышиных гибридом, быстрое выведение мАТ из организма, неспособность Fc-фрагмента мАТ животных полноценно активировать защитные функции иммунитета в организме человека из-за видовых различий, подвергли сомнению универсальность и безопасность их применения в медицине.

Наиболее очевидной стратегией получения мАТ с минимальной иммуногенностью [64], но, в то же время, сохраняющих необходимые антигенсвязывающие свойства стала химеризация, а затем гуманизация мАТ животного происхождения. Химерные антитела, содержащие в своей структуре более 65% последовательности иммуноглобулина человека, сохраняют только вариабельные домены антител, полученных при иммунизации животных. Используя такой подход, были получены химерные антитела 62-71-3 и E559, экспрессированные в листьях табака, которые оказались подходящими кандидатами для нового коктейля антител [55]. Допущение о том, что высокое процентное содержание последовательности иммуноглобулина человека может обеспечить наибольший терапевтический эффект и уменьшить иммуногенность, привело к созданию в 1986 г. гуманизированного мАТ. Гуманизированное мАТ на 95%

состоит из иммуноглобулина человека, и только антигенсвязывающие регионы (CDRs) взяты от антитела мыши. Примером получения гуманизированного антитела к RABV является (Fab)2-фрагмент антитела 1C5, экспрессированный в дрожжевых клетках [65]. При иммунизации мышей штаммом Внуково-32 RABV учеными были получены гибридомы, продуцирующие мАТ к RABV. Панель секретируемых гибридомами антител была проверена на наличие взаимодействия со штаммами, выделенными в России, Африке, Центральной Европе, Украине и США. В результате для дальнейшей гуманизации было отобрано антитело мыши 1C5, которое продемонстрировало нейтрализующую активность в отношении всех тестируемых штаммов RABV. В экспериментах *in vivo* антитело 1C5 показало 100%-ную эффективность в предотвращении развития бешенства у мышей, зараженных сверхлетальными дозами RABV, в то время как коммерческий иммуноглобулин лошади «Антирабический иммуноглобулин из сыворотки лошади» (пр-во ЗАО «БИОЛЕК», Украина) предотвратил гибель только 16% мышей.

мАТ человека являются минимально иммуногенными молекулами, поэтому многие современные методы направлены на их получение. Так, получили широкое применение методы скрининга мини-антител (scFv) или Fab-фрагментов антител человека нужной специфичности из комбинаторных библиотек с использованием фагового, рибосомного и дрожжевого дисплея с последующим конструированием на основе отобранных фрагментов полноразмерных иммуноглобулинов человека. Экспонирование пептидов и белков на поверхности нитчатого фага – метод фагового дисплея – дает возможность отбирать белки, в т.ч. антитела, с желаемыми свойствами из огромного набора вариантов. Так были получены антирабические антитела CR4098, AR16. В обоих случаях для конструирования библиотеки антител были использованы В-лимфоциты, выделенные из периферической крови вакцинированных доноров. Принципом, лежащим в основе данного метода, является непосредственная связь фенотипа белка, находящегося на поверхности фаговой частицы, и соответствующего ему генотипа. Фаговый дисплей позволяет экспонировать обширные библиотеки (108–1011 вариантов) пептидов и белков на поверхности нитчатого фага, которые в результате подвергаются селекции в сторону высокоаффинного и специфичного связывания практически с любой мишенью. Метод является высокопродуктивным, однако имеет недостаток, заключающийся в отборе искусственно созданных репертуаров антител (в случае

мутантной библиотеки), которые могут быть иммуногенными для людей. С целью получения клона, который в дальнейшем стал прототипом антитела CR4098, были созданы две независимые библиотеки (1,2 × 107 и 9,3 × 106 клонов соответственно), для конструирования которых были использованы гены В-лимфоцитов, полученные от четырех иммунных доноров. Секвенирование случайных клонов из созданных библиотек и выравнивание их с нуклеотидными последовательностями зародышевых линий показало покрытие большого репертуара донорских антител. Селекцию антител проводили с помощью инактивированного вируса и очищенного гликопротеина RABV. С учетом подбора условий селекции специфических к RABV антител всего было проведено 40 раундов биопеннинга. Антитело AR16 было выделено из аналогичной библиотеки размером 6 × 107 клонов в результате четырех раундов с использованием синтетического пептида G5-24, включающим в себя АС G5. Периферические В-лимфоциты были взяты у трех доноров, которые были иммунизированы вакциной Verorab («Aventis Pasteur», Франция), содержащей инактивированный штамм вируса Wistar rabies PM/WI 38 1503-3M.

Существует еще ряд подходов, основанных на работе с В-клетками человека, точнее со способами иммортализовать их. Для этого могут использоваться иммунные В-лимфоциты человека, выделенные из периферической крови (В-клеточное клонирование) или В-лимфоциты человека, иммунизированные *in vitro*. В обоих случаях В-клетки иммортализуют посредством трансформации вирусом Эпштейна-Барр или путем слияния с миеломным партнером. Отличие состоит в способах активации самих В-лимфоцитов. Так, В-клеточное клонирование по сути представляет собой отбор наиболее перспективных по способности взаимодействовать с антигеном В-лимфоцитов из огромного пула клонов, выделенных прямо из периферической крови вакцинированного донора. В то время как иммунизация *in vitro* подразумевает активацию В-лимфоцитов непосредственно в пробирке, где создаются условия для созревания В-клеток. Антитела человека RVC-20, RVC-58, No.254 и 4D4 были получены в результате трансформации вирусом Эпштейна-Барр В-лимфоцитов, антитело же CR57 было выделено из гетерогибридомы. Обе рабочие группы использовали иммунные В-лимфоциты от вакцинированных доноров.

Среди известных в настоящее время антител-кандидатов для замещения RIG в рамках экстренной профилактики бешенства в первую очередь необходимо отметить коктейль CL184, состоящий из двух вируснейтрализующих антител человека, который был получен компанией Crucell. Историю создания коктейля CL184 можно разделить на два этапа. Первое антитело, CR57, связывающееся с АС I гликопротеина, было получено из В-клеток донора, вакцинированного против RABV. Полученные В-клетки были иммортализованы путем создания гетерогибридомы. Определение эпитопа мАТ CR57 проводили с помощью иммуноферментного анализа, где в качестве антигена использовали набор пептидов, входящих в состав гликопротеина, и панели мутантов, устойчивых к нейтрализации. Детальный анализ участка связывания для мАТCR57 показал минимальный участок гликопротеина, включающий в себя 226–231 а.о. (KLCGVL), среди которых 4 а.о. (K-CGV) являются критичными для связывания с АТ. Анализ базы данных, содержащей последовательности гликопротеина большой группы природных изолятов RABV, показал, что 3 из 229 вариантов (~1%) содержат мутации, которые могут привести к нарушению взаимодействия с мАТ CR57. Полученные данные указывают на высокую степень консервативности эпитопа мАТ CR57, которая может быть связана с участием центрального остатка цистеина в фолдинге молекулы гликопротеина вируса [26]. Эти данные были подтверждены экспериментально: исследование нейтрализующей активности, которое проводили с использованием 26 уличных штаммов RABV, показало, что мАТ CR57 нейтрализует 24 из них *in vitro*. В виду обнаружения вариантов вируса, избежавших нейтрализации, была проведена работа по поиску антитела-партнера для комбинации с полученным ранее мАТ CR57. Второе антитело, входящее в состав коктейля, CR4098, связывается с АС II гликопротеина. Данное мАТ было получено с применением технологии фагового дисплея. Селекцию антител из репертуара библиотеки проводили с использованием различных форм антигена: инактивированного вируса, очищенного из вирусных частиц нативного гликопротеина и гликопротеина, экспрессированного на поверхности клеток. Исследование нейтрализующей активности антител, выделенных в результате нескольких раундов селекции, выявило 39 уникальных вируснейтрализующих антител. Из них было отобрано антитело, не конкурирующее за связывание гликопротеина с мАТCR57, которое нейтрализовало максимальное количество исследуемых штаммов вируса, в т.ч. варианты, которые избегали нейтрализации антителом CR57. CR4098

дополняет CR57, и, таким образом, комбинация этих мАТ нейтрализует 26 из 26 тестируемых штаммов RABV. В дальнейшем эффективность CL184 была подтверждена на животных. Препарат CL184, экспрессированный в клетках PER.C6, прошел I и II стадии клинических исследований [66], [67], [68], и в ближайшем будущем предполагается начало III стадии.

Дальнейшее усовершенствование методов получения антител человека к гликопротеину RABV, в т.ч. нейтрализующих, способствует созданию представительных панелей мАТ, что дает возможность отбирать наиболее перспективные варианты для клинического использования. Так, например, в работе De Benedictis et al. [56] были выделены из крови четырех вакцинированных доноров B-клетки памяти, продуцирующие иммуноглобулины класса G против RABV. Последующие иммортализация клеток вирусом Эпштейна-Барр, клонирование и микроколичественное тестирование супернатантов на способность нейтрализовать псевдотип CVS-11 RABV привели к отбору 500 мАТ человека, из которых 21 проявляло наибольшую нейтрализующую активность. Последний этап представлял собой эксперименты по изучению диапазона нейтрализующей активности 21 мАТ против 13 различных видов лиссавирусов (22 псевдотипа и 15 живых вирусов). В результате было установлено, что мАТ RVC-20 (связывается с АС I) и RVC-58 (связывается с АС III) нейтрализовали все участвовавшие в тесте изоляты с высокой степенью активности.

Создание трансгенных линий мышей, способных продуцировать антитела человека, сводится к двум задачам: нокаут собственных иммуноглобулиновых генов мыши и встраивание в мышиный геном генов иммуноглобулинов человека. Затем проводится скрещивание данной особи с мышью, у которой отсутствуют свои иммуноглобулиновые гены. Получение трансгенных мышей – очень сложный и дорогой процесс, и даже возможность приобретения уже готовых мышей совсем не способствует распространению данного метода, для получения мАТ человека. Примером успешной работы с трансгенными мышами («Bristol-Myers Squibb», США), иммунизированных вакцинами для человека RabAvert® («Novartis», Швейцария) или Imovax® («Sanofi Pasteur», Франция), является антитело человека RABV1 (17C7).Оно продемонстрировало нейтрализующую активность в 92% случаев в эксперименте с расширенной панелью вирусных изолятов (25 вариантов), выделенных в Северной и

Южной Америке, Европе, Африке и Азии, на основании чего было отобрано из 8 антител, уже подтвердивших активность против CVS-11. В процессе определения АС для мАТ RABV1 было установлено, что оно взаимодействует с АС III, где важную роль при связывании играет Asn336, при этом были обнаружены еще два а.о. (342 и 343), которые тоже вносят вклад во взаимодействие RABV1 с гликопротеином [8]. На данный момент мАТ 17C7, полученное из линии CHO, прошло III стадию клинических испытаний [69].

Обобщая вышеизложенную информацию, легко заметить, что ключевой характеристикой антител для профилактики развития бешенства является их вируснейтрализующая активность. Стандартными методами ее определения по отношению к RABV считаются два теста *in vitro*: флюоресцентный вируснейтрализующий тест (fluorescent antibody virus neutralization, FAVN) и тест быстрого торможения фокуса флюоресценции (rapid fluorescent foci inhibition, RFFIT). В качестве антигена используется хорошо изученные стандартные штаммы CVS-11 или ERA RABV. На этапе исследований *in vivo*, проводимых зачастую на хомяках, осуществляют сравнение профилактической активности антител, HRIG и вакцин. Для изучения способности антител блокировать широкий спектр штаммов RABV подбирают варианты, относящиеся к разным филогруппам, регионам и странам. Самые широкомасштабные исследования нейтрализующей активности были выполнены компанией Crucell, разработавшей коктейль из двух антител человека CR57 и CR4098, группой ученых под руководством De Benedictis, P. [56] (антитела человека RVC-20 и RVC-58), World Health Organization Rabies Collaborating Centers (химерные антитела 62-71-3 и E559) и Serum Institute of India Ltd. (антитело человека RABV1). В рамках этих экспериментов была проведена работа с 25–37 различными штаммами.

Таким образом, прогресс молекулярной генной инженерии и потребность в антителах для медицины значительно повлияли на вектор развития методов получения антител. Все больше уходят в прошлое химерные и гуманизированые антитела, на смену которым приходят антитела человека. В связи с этим, освоение и усовершенствование методов получения таких антител становится наиболее востребованным направлением исследований.

В рамках темы настоящего обзора изучение и подтверждение нейтрализующей активности – наиболее важный этап в процессе разработки препаратов на основе антител против RABV. Необходимо грамотно подбирать вирусные штаммы для тестов, которые были бы наиболее представительными, важно определять возможные мутации в АС, благодаря которым отдельные изоляты ускользают от нейтрализации. Также стоит использовать в качестве препарата сравнения HRIG, чтобы с уверенностью можно было утверждать об успешности применения мАТ, которые могут эффективно изменить парадигму ПЭП человека.

Обеспечение эффективной наработки антител. Важными характеристиками для оптимального выбора системы продукции рекомбинантных антител, являются способность осуществлять правильный фолдинг и гликозилирование белков, параметры производительности, простота очистки, качество и количество продукта, безопасность последующего применения рекомбинантных белков для человека. Также при производстве антител необходимо учитывать время, которое потребуется на проведение клинических испытаний и выход препарата на рынок, а также стоимость товара и нормы правового регулирования. Эукариотические системы, такие как клетки млекопитающих, клетки насекомых, дрожжей и растений являются наиболее перспективными для экспрессии рекомбинантных мАТ человека. В основном для них используют клетки млекопитающих, т.к. они обеспечивают фолдинг и гликозилировние мАТ, максимально близкое антителам человека. Уровень продукции мАТ в таких системах благодаря процессам оптимизации может превышать 10–15 г/л.

Терапевтические мАТ, одобренные для клинического применения на данный момент, производят в клетках млекопитающих, используя, как правило, одну из трех клеточных линий: опухоли яичников китайского хомячка (CHO), клетки несекретирующей миеломы мыши (NS0) и клетки миеломы мыши (SP2/0). Также для продукции мАТ применяется линия эмбриональной ретинобластомы человека (PER.C6). Получение рекомбинантных антител против RABV, упомянутых выше, осуществлялось с помощью клеточных линий CHO или PER.C6. Исключением являются химерные антитела 62-71-3 и E559, которые были экспрессированы в растительных клетках Nicotiana benthamiana.

Клеточная линия CHO стала самой используемой системой для промышленного производства рекомбинантных белков и даже превзошла некоторые микробные системы в производительности. Тем не менее, она имеет определенные ограничения, такие как высокая чувствительность к изменению кислотности среды, уровню углекислого газа, температуре, концентрации кислорода, влиянию гидродинамических сил – все это значительно усложняет процесс культивирования клеток и масштабирования. Клеточная линия PER.C6 была разработана в качестве альтернативы CHO-клеткам для крупномасштабного производства рекомбинантных мАТ человека. Линия PER.C6 может быть адаптирована к росту в различных условиях, при этом клетки характеризуются высоким уровнем продукции рекомбинантных белков, однако также чувствительны к вышеперечисленным параметрам.

Культивирование клеток насекомых, трансформированных рекомбинантным бакуловирусом, является менее сложным процессом по сравнению с выращиванием клеток млекопитающих. Клетки насекомых не требуют подачи CO2, растут при невысокой температуре (27–28 °C), оптимальные значения pH среды для таких культур находятся в диапазоне 6,1–6,5 и легко поддерживаются буферной системой ростовой среды [70]. При всей своей «неприхотливости» клетки насекомых способны нарабатывать не меньше целевого продукта, чем клетки млекопитающих, и выполнять посттрансляционные модификации белка. Однако нужно учитывать, что генотип трансформированных клеток насекомых не стабилен, если предполагается продолжительное культивирование. Помимо нестабильности генома вируса, система экспрессии насекомых является достаточно затратной, а сами клетки еще более чувствительны к воздействию гидродинамических сил, чем клетки линии CHO. Линии клеток насекомых (HiFive, Sf-9) чаще используются для производства вакцин.

Из всего разнообразия объектов растительного происхождения, которые могут быть использованы в биотехнологии (каллусная культура, суспензионная культура, культура корневых волосков, изолированные зародыши, органы и культура протопластов), для продукции антител наибольшее применение находят суспензионные культуры, благодаря относительной простоте работы с ними и наибольшим выходом экспрессируемого продукта. BY-2 является самой изученной суспензионной клеточной линией растений, выведенной в 1972 г. В числе недостатков использования культуры

клеток растений выделяют неполную изученность клеточного метаболизма, низкую продуктивность и гетерогенность нарабатываемого продукт. Также растительным культурам необходим особый режим долгосрочного хранения. Тем не менее, генная инженерия растений привела к получению мАТ растительного происхождения, которые обеспечивают безопасную и экономически обоснованную альтернативу современным методам производства антител в клетках животных, чему способствуют более дешевые растительные среды и сам биопроцесс, отсутствие вредоносных вирусов и наличие посттрансляционных модификаций. Известное мАТ CR57 было экспрессированно также и в растительных клетках, после чего его изучали в сравнении с аналогом, выделенным из культуры клеток человека. Полученные данные демонстрируют, что мАТ CR57 растительного происхождения обладает вируснейтрализующей активностью и аффинностью, сопоставимыми с этими же свойствами мАТ, полученного в клетках линии PER.C6 [71]. Растительное антитело быстрее выводится из организма в связи с наличием олигоманнозных N-гликанов в его структуре, однако это не оказывает негативного влияния на его нейтрализующие свойства против RABV.

Дрожжевые и бактериальные продуценты требуют наименьших затрат и усилий при производстве рекомбинантных белков. Они применяются для получения относительно небольших белков с молекулярной массой не более 100 кДа, т.к. часто уровень экспрессии молекул с большими массами является достаточно низким. Важным отличием дрожжевой системы экспрессии от бактериальной является осуществление гликозилирования по эукариотическому типу, которое, однако, не полностью соответствует посттрансляционным модификациям трех упомянутых выше систем (клетки млекопитающих, насекомых и растительные клетки). По сравнению с клетками млекопитающих основные преимущества дрожжевой экспрессии в том, что последним необходима недорогая среда конкретного состава и что они способны к быстрому росту и размножению, достигая высокой плотности (100 г сухой массы клеток/л) за короткое время. Многие дрожжевые штаммы имеют статус полностью безвредных – GRAS статус (generally regarded as safe) и не продуцируют эндотоксины, благодаря чему могут быть использованы для экспрессии антител с терапевтической направленностью применения. Наиболее подходящим штаммом дрожжей для продукции антител является *Pichia pastoris* [72]. Для нарабатывания рекомбинантных антител в дрожжах необходима N-концевая сигнальная последовательность, направляющая выделение по секреторному

пути дрожжей. В случае с Fab-фрагментом, его обе цепи должны быть объединены с лидерной последовательностью препро-альфа-фактора и котрансформированы в клетки дрожжей, в результате чего синтезируемые молекулы будут накапливаться в секреторных гранулах [73]. Экспрессируемые рекомбинантные белки могут накапливаться и в цитоплазме клеток, после чего их выделяют по традиционной схеме с использованием многостадийной очистки из бесклеточных экстрактов, получаемых после разрушения клеток.

Клетки грамм-отрицательной бактерии *Escherichia coli* сегодня успешно используют для получения таких фрагментов антител, как Fab, scFv, Fv, однако продукция полноразмерных мАТ для терапевтического применения в бактериальных клетках не представляется возможной. *E.coli* имеет две мембраны, которые обеспечивают для производства белка создание трех компартментов, а именно: 1) цитоплазма, 2) периплазама, 3) культуральная среда. Среди этих трех компартментов периплазма, благодаря ее окисляющим условиям [74], и культуральная жидкость [75] являются наиболее подходящим местом для продукции антител, имеющих дисульфидные связи. Это в особенности важно при экспрессии Fab-фрагментов антител, структура которых поддерживается пятью цистеиновыми мостиками. Без образования межмолекулярных цистеиновых контактов невозможна сборка функционального Fab-фрагмента. При цитоплазматической секреции количество нарабатываемого белка может быть заметно выше, однако восстановительные условия среды разрушают дисульфидные связи. Кроме этого, многие антитела, продуцируются в цитоплазме в виде нерастворимых телец включения. Дальнейшие их ренатурация и рефолдинг могут привести к частичной потере целевого продукта.

Оптимальной системой экспрессии терапевтических мАТ, которые в абсолютном большинстве представлены полноразмерными молекулами, являются клетки млекопитающих или человека, обеспечивающие все необходимые посттрансляционные модификации. Вместе с тем при выборе определенной системы экспрессии для производства терапевтических препаратов на основе рекомбинантных белков необходимо также учитывать стоимость производства и соотносить ее с возможностями целевой группы населения, нуждающейся в препарате. Таким образом, в некоторых случаях имеет смысл осваивать недорогие системы экспрессии, такие как дрожжи и

растения. В результате многолетних исследований структуры и жизненного цикла RABV к настоящему времени достигнуты значительные успехи в экстренной профилактике заболевания. мАТ человека, нейтрализующие RABV, должны в будущем прийти на смену поликлональным сывороткам ERIG и HRIG, характеризующимся высокой иммуногенностью (ERIG), дороговизной и ограниченной доступностью (HRIG). Эффективность использования коктейля нейтрализующих мАТ человека, связывающихся с неперекрывающимися эпитопами гликопротеина, подтверждена в экспериментах *in vivo* и в клинических испытаниях.

Прведенный анализ литературы по теме дисертации подтверждает актуальность и обоснованность выбора цели и задач исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

В работе использованы следующие расходные материалы: 96-луночные планшеты Nunc MaxiSorp для ИФА (Nunc, Дания); микроцентрифужные пробирки объемом 0,5, 1,5 и 2,0 мл (SSI, США); центрифужные пробирки объемом 15 мл и 50 мл Greiner Bio One (США); одноразовые чашки Петри (Greiner Bio-One, Германия), матрасы и планшеты для суспензионных культур (Greiner Bio-One, Германия), нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США), PVDF фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США), одноразовые серологические пипетки объемом 10 и 50 мл, концентраторы Amicon Ultra 30K (Ирландия).

В работе использовали следующие реактивы: акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, хелатирующая IDA-сефароза (все Amersham Pharmacia Biotech, США); глицерин, соли и буферы квалификации «хч» и «осч» (Реахим, Россия), трис-гидроксиметиламинометан (трис), 2-меркаптоэтанол, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), бычий сывороточный альбумин (БСА), персульфат аммония, додецилсульфат натрия (SDS), имидазол, эндонуклеазы рестрикции с соответствующими буферами NdeI, XhoI (Thermo Scientific, США); Т4-ДНК-лигаза, маркеры молекулярных масс ДНК и белков, праймеры M13/pUC 46F и M13/pUC 46R (Fermentas, Литва); ДНК-полимераза Tersus (Евроген, Россия); ДНК-полимераза Taq (Евроген, Россия); щелочная фосфатаза (Сбэнзим, Россия). Также были использованы бакто-агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco, США); агароза; дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (Fermentas, Литва); Tween, IPTG (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид), X-Gal (5-Бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид), ампициллин, все растворы готовили на воде MilliQ.

Штаммы E. coli XL1-Blue (a,b 3 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F′ proABlacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]) (Stratagene, США) и TG1 (supE thi-1 delta(lac-proAB) delta(mcrB-hsdSM)5(rK- mK-) [F' traD36 proAB lacIqZdeltaM15]) (Novagen, США).

Буферные растворы

Буфер ТАЕ: 50 мМ Трис-ацетат (pH 8.0), 20 мМ ацетат натрия, 2 мМ ЭДТА.

Трисглициновый буфер: 0.025 М Трис-HCl pH 8.4, 0.192 М глицин, 0.1% SDS.

Буфер для нанесения белковых образцов 1 (pH 6.8): 60% глицерин, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 10% SDS, 250 мМ Трис-HCl.

Буфер для нанесения белковых образцов 2 (pH 6.8): 60% глицерин, 10% SDS, 250 мМ Трис-HCl.

ФСБ (pH 7.3): 1.47 мМ KH_2PO_4, 4.29 мМ $Na_2HPO_4 \times 7H_2O$, 137 мМ NaCl, 2.68 мМ KCl.

Буфер для диализа: 1×ФСБ.

Калий-фосфатный буфер (pH 7.5): 47 мМ K_2HPO_4, 3 мМ KH_2PO_4, 500 мМ KCl, 0.001 % PMSF, 0.025% NaN_3.

Многокомпонентные растворы:

RF1(pH 5.8): 100 мМ KCl, 50 мМ $MgCl_2 \times 2H_2O$, 30 мМ KOAc, 10 мМ $CaCl_2 \times 2H_2O$, 15% глицерин.

RF2 (pH 6.8): 10 мМ MOPS, 10 мМ KCl, 75 мМ $CaCl_2 \times 2H_2O$, 15% глицерин.

(Растворы RF1, RF2, 50×M и 50×5052 были стерилизованы фильтрованием через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм.)

Микробиологические среды

Среда LB: 1% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 0.5% хлорид натрия.

Агаризованная среда LB: 1% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 0.5% хлорид натрия, агар до концентрации 1.5%.

Среда 2×YT: 1.6% триптон, 1% дрожжевой экстракт, 0.5% хлорид натрия.

Среда SOB: 2% триптон, 0.55% дрожжевой экстракт, 10 мМ хлорид натрия, 10 мМ хлорид калия. После автоклавирования необходимо добавить 5 мМ хлорид магния и 5 мМ сульфат магния.

Среда SOC: 2% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 10 мМ хлорид натрия, 2,5 мМ хлорид калия, 10 мМ хлорид магния, 10 мМ сульфат магния, 20 мМ глюкоза.

(Все среды автоклавировалась в течение 45 мин при давлении 0,2 МПа и хранилась при комнатной температуре.)

Эукариотические среды и реактивы

Питательная среда DMEM, питательная среда RPMI 1640, питательная среда OptiCHO (Invitrogen, США), раствор пенициллин-стрептамицин-фунгизон (Anti-anti) (Invitrogen, США), фетальная телячья сыворотка и L-глутамин (Gibco, США).

Приготовление полной ростовой среды с ГАТ

Сухую среду DMEM с высоким содержанием глюкозы (HyClone, США) растворяли в деионизованной воде согласно рекомендациям производителя, добавляли бикарбонат натрия до концентрации 3,7 г/л и гентамицин до концентрации 40 мг/л. После полного растворения стерилизовали фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм в асептических условиях. Добавляли сыворотку плода коровы с добавлением сыворотки новорожденных телят до концентрации 4%, L-глутамин, пируват натрия. Готовую ростовую среду хранили при 4°C не более 2-х месяцев. ГАТ (гипоксантин, аминоптерин, тимидин) добавляли непосредственно перед использованием.

МЕТОДЫ

Синтез генов вариабельных доменов с помощью перекрывающихся праймеров и ПЦР

Последовательности вариабельных областей легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей мАТ 1С5 были взяты из [65], [76], референтных мАТ CR57 Crucell и мАТ CR4098 Crucell взяты из патента US007959922B2 [77]. VL и VH последовательности мАТ 1С5, мАТ CR57 и мАТ CR4098 были синтезированы из олигонуклеотидов с помощью ПЦР. Олигонуклеотиды имели длину от 40 до 50 пар оснований, при этом они попарно перекрывались между собой (10-12 оснований) и имели приблизительно одинаковую температуру отжига (50-53 °C). На концы синтезированных вариабельных доменов были введены последовательности для объединения их с ДНК-фрагментами, кодирующими лидерный пептид с одной стороны и константный домен с другой.

Структура олигонуклеотидов, использованных для химико-ферментативного синтеза и амплификации VL и VH мАТ 1С5, мАТ CR57 и мАТ CR4098 представлена в таблицах 1-6.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные для синтеза нуклеотидной последовательности VL цепи мАТ 1С5

VL 1C5	
1C5VL1-F	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTG
1C5VL1-R	CCGACAAGTGAGACTGACTCTGTCTCCCACAGAGGCAGATA
1C5VL2-F	TCACTTGTCGGGCAAGTCAGGACATTGGAAGTAGGTTAAACTG

	GA
1C5VL2-R	GGCGTTTAATGGCTCCGTCTGGTTCCTGCTGAATCCAGTTTAAC
1C5VL3-F	ATTAAACGCCTGATCTACGCCACATCCAGTTTAGATTCTGGTGT
1C5VL3-R	TGACCCAGACCTACTGCCACTGAACCTTTTGGGGACACCAGAA TCT
1C5VL4-F	GGTCTGGGTCAGATTATACCCTCACCATCAGCAGCCTTCAGC
1C5VL4-R	ACAGTAATAGCCAACAAAATCTTCGGGCTGAAGGCT
1C5VL5-F	GGCTATTACTGTCTACAATATGCTACTTCTCCGTACACGTTCG
1C5VL5-R	CCGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCCCCCTCCGAACGTGTAC

Таблица 2. Олигонуклеотиды, использованные для синтеза нуклеотидной последовательности VH мАТ 1C5

VH 1C5	
1C5VH1-F	CGGGTCCAACTGGTGCAGAGCGGGTCTGTAGTGGTGAGGCCTG
1C5VH1-R	CAGAGGTTTTGCAGGACACCTTCACTGAGGCTCCAGGCCTCAC
1C5VH2-F	AAAACCTCTGGCTACATCTTCACCAGTTTTTGGATGCACTGGG
1C5VH2-R	ATCCACTCAAGGCCTTGTCCAGGGGCCTGTCTCGCCCAGTGCAT
1C5VH3-F	CTTGAGTGGATTGGACAGATTCATCCTAATAGTGATTATACTAAC TAC
1C5VH3-R	AGTCAGTGTGGCTCTGCCCCTGAATTTCTCATTGTAGTTAGTATA ATC
1C5VH4-F	CCACACTGACTGTAGACATATCCACCAGCACAGTCTACGTGGAG CTCA
1C5VH4-R	AATAGACCGCGGTGTCCTCAGATGTCAGGCCGCTGAGCTCCAC
1C5VH5-F	GCGGTCTATTACTGTGCAAGAGAGGATTACGACGAGGGGTTTGA TAACT
1C5VH5-	TGCAGAGACAGTGACCAGAGTCCCTTGGCCCCAGTTATCAAAC

R	

Таблица 3. Олигонуклеотиды, использованные для синтеза нуклеотидной последовательности VL мАТ CR57

VL CR57	
CR57VL1-F	CAGAGCGCCCTCACCCAGCCCAGAAGCGTGAGCGGCAGCCCTG
CR57VL1-R	TGCCGGTGCAGCTGATGGTCACGCTCTGGCCAGGGCTGCCGC
CR57VL2-F	GCTGCACCGGCACCAGCAGCGACATCGGCGGCTACAACTTCGTGA
CR57VL2-R	GGGGCCTTGCCGGGGTGCTGCTGATACCAGCTCACGAAGTTGT
CR57VL3-F	GCAAGGCCCCTAAGCTCATGATCTACGACGCCACCAAGAGA
CR57VL3-R	TTGCTGCCGCTGAATCTGTCGGGCACGCCGCTGGGTCTCTTGGTGG
CR57VL4-F	AGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTCACCATC
CR57VL4-R	AGTCGGCCTCGTCCTCGGCCTGCAGTCCGCTGATGGTGAGGCT
CR57VL5-F	CGAGGCCGACTACTACTGCTGCAGCTACGCCGGCGACTACACCCCT
CR57VL5-R	TAGGACGGTAAGCTTGGTGCCTCCGCCGAACACCACGCCAGGGGTGTAGT

Таблица 4. Олигонуклеотиды, использованные для синтеза нуклеотидной последовательности VH мАТ CR57

VH CR57	
CR57VH1-F	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCAG
CR57VH1-R	GTGCCGCCGCTGGCCTTGCAGCTCACCTTCACGCTGCTGCCGGGCTT
CR57VH2-F	AGCGGCGGCACCTTCAACAGGTACACCGTGAACTGGGTGAGACAG
CR57VH2-R	TGATGCCGCCCATCCACTCCAGGCCCTGGCCTGGGGCCTGTCTCACC

CR57VH3-F	GGGCGGCATCATCCCTATCTTCGGCACCGCCAACTACGCCCAGA
CR57VH3-R	CTCTCGTCGGCGGTGATGGTGAGCCTGCCCTGGAATCTCTGGGCGTA
CR57VH4-F	GCCGACGAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAAGC
CR57VH4-R	GTTCTCCCTGGCGCAGAAGTACACGGCGGTGTCATCGCTTCTCAGGCT
CR57VH5-F	GCCAGGGAGAACCTGGATAACAGCGGCACCTACTACTACTTCAGCGGCTGGT
CR57VH5-R	TGAGCTCACGGTCACCAGGGTGCCCTGGCCCCAGGGGTCGAACCAGCCGCTGA

Таблица 5. Олигонуклеотиды, использованные для синтеза нуклеотидной последовательности VL мАТ CR4098

VL CR4098	
CR4098VL1-F	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG
CR4098VL1-R	GACTTGCCCGGCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGATGCA
CR4098VL2-F	CCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAG
CR4098VL2-R	GGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCTGCTGATACCAGC
CR4098VL3-F	CCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGG
CR4098VL3-R	CCAGATCCACTGCCGCTGAACCTTGATGGGACCCCACTTTGCAA
CR4098VL4-F	AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGC
CR4098VL4-R	GTTGACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTG

CR4098VL5-F	ATTACTGTCAACAGCTTAATAGTTACCCTCCCACTTTCGG
CR4098VL5-R	TTTGATTTCCACCTTGGTCCCTCCGCCGAAAGTGGG

Таблица 6. Олигонуклеотиды, использованные для синтеза нуклеотидной последовательности VH мАТ CR4098

VH CR4098	
CR4098VH1-F	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGCGGTCCAGCCTGGGA
CR4098VH1-R	GAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAGGGACCTCCCAGGCTGG
CR4098VH2-F	CCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGG
CR4098VH2-R	CAGCCACCCACTCCAGCCCCTTGCCTGGAGCCTGGCGGACC
CR4098VH3-F	TGGGTGGCTGTTATATTATATGATGGAAGTGATAAATTCTATGCAG
CR4098VH3-R	GTCTCTGGAGATGGTGAATCGGCCCTTCACGGAGTCTGCATAGAAT
CR4098VH4-F	TCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCC
CR4098VH4-R	CGCACAGTAATACACAGCCGTGTCCTCAGCTCTCAGGCTGTTCAT
CR4098VH5-F	ATTACTGTGCGAAAGTAGCAGTGGCTGGTACGCACTTTGACTACTGGG
CR4098VH5-R	GCTCGAGACGGTGACCAGGGTTCCCTGGCCCCAGTAGTCAA

Получение В-лимфоцитов человека, продуцирующих мАТ к ГПВБ

Выделение человеческих клеточных субпопуляций

Субпопуляции моноцитов, В-лимфоцитов и CD4+ Т-лимфоцитов были выделены из периферической крови человека, иммунизированного вакциной Рабипур® (“Chiron Behring Vaccines Private Ltd.”, Индия), с использованием наборов RosetteSep™

(“StemCell Technologies Inc.”, США). Кровь была взята в пробирки с антикоагулянтом К+ ЭДТА, при соблюдении стерильных условий. Процесс выделения клеток включал следующие стадии: добавление к цельной крови препарата для выделения одной из трех субпопуляций из расчета 50 мкл на 1 мл крови, перемешивание и инкубация в течение 20 мин при комнатной температуре; разбавление образца равным объемом ФСБ с добавлением 2%-ной фетальной телячьей сыворотки и 1мМ ЭДТА, перемешивание; наслаивание образца на раствор Ficoll-Paque Plus и центрифугирование в течение 20 мин при 1200 g и комнатной температуре; перенос клеток, находящихся между плазмой и раствором Ficoll-Paque Plus с частью фиколла в новые пробирки с последующей отмывкой раствором ФСБ с добавлением 2% фетальной телячьей сыворотки и 1мМ ЭДТА. Клетки были подсчитаны в камере Горяева и заморожены в среде, содержащей 40% ФСБ и 10% ДМСО.

Получение зрелых дендритных клеток, нагруженных ГПВБ

Моноциты в количестве 1.1 млн клеток были разморожены, осаждены центрифугированием в течение 10 минут при 1000 g и ресуспендированы в среде CellGroR Dendritic Cell Medium (“CellGenix GmbH”, Германия) с добавлением 500 ед./мл интерлейкина 4 (ИЛ4) и 800 ед./мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). Моноциты были высеяны в лунки 6-луночного планшета по 170000 клеток/лунку в 3-х мл. Клетки были выдержены в течение 5 сут при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO_2. После чего было изучено состояние клеток под микроскопом – они морфологически соответствовали незрелым дендритным клеткам.

К незрелым дендритным клеткам был добавлен коммерческий рекомбинантный ГПВБ до конечной концентрации 5 мкг/мл (“MyBioSource”, США), представляющий собой экстрацеллюлярный домен (20-459 а.о.) G-белка вируса бешенства штамма ERA. Клетки были выдержены в течение 24 ч при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO_2, морфологию клеток была изучена под микроскопом

In vitro стимуляция В-лимфоцитов человека

Сначала было выполнено культивирование выделенных из периферической крови человеческих В-лимфоцитов в количестве 2.8 млн клеток в среде CellGroR Stem Cell

Growth Medium (“CellGenix GmbH”, Германия) в течение 4 ч при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO_2, вместе с антигеном ГПВБ (5 мкг/мл).

CD4+ Т-лимфоциты в количестве 2 млн клеток были размморожены, осаждены в течение 10 мин при 1000 g, ресуспендированы в среде CellGroR Stem Cell Growth Medium (“CellGenix GmbH”, Германия) и высеяны в культуральный флакон площадью 25 $см^2$.

Образовавшиеся из моноцитов дендритные клетки были сняты скребком со дна планшета и добавлены к CD4+ Т-лимфоцитам в количестве 70000 клеток и оставлены на 3.5 ч при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO_2. По истечении времени инкубации во флакон с имеющимися там CD4+ Т-лимфоцитами и дендритными клетками были внесены подготовленные В-лимфоциты. Затем были добавлены: ИЛ2 (20 ед./мл), ИЛ4 (500 ед./мл), ИЛ6 (1800 ед./мл), ИЛ10 (2 ед./мл). Через 5 сут культивирования к клеткам был добавлен митоген лаконоса Phytolacca americana (4 мкг/мл; “Sigma-Aldrich”, США) [78]. Ещё через 3 сут клетки были собраны путем центрифугирования при 1200 g в течение 10 мин. Клеточный осадок был использован для получения гетерогибридом.

Соматическая гибридизация иммунных В-лимфоцитов человека с клетками миеломы

Получение гетерогибридных клеток человек-мышь в качестве партнера для слияния

Мышиная миелома NS1 (ATCC® TIB-18™) и лимфоциты периферической крови человека были слиты по стандартной методике [63]. После утраты антителопродукции у слившихся гетерогибридных клеток были получены ГАТ-чувствительные мутанты путем длительного культивирования на среде, содержащей 8-азагуанин. Чувствительность контролировалась после удаления 8-азагуанина из культуральной среды и добавления ГАТ в концентрациях, рекомендованных производителем. Популяции гетерогибридных клеток, не содержащие резистентных к ГАТ клеток, были использованы для соматической гибридизации с В-лимфоцитами.

Осуществление гибридизации В-лимфоцитов с гетерогибридными клетками

Клетки после процедуры *in vitro* стимуляции были собраны суспендированием и последующим центрифугированием при 1200 об/мин в течение 10 мин. Культивирование клеток ГАТ-чувствительной пустой гетерогибридомы было выполнено в чашках Петри в присутствии 8-азагуанина, после чего клетки были собраны центрифугированием при 1200 об/мин в течение 10 минут. Клеточные осадки были ресуспендированы в бессывороточной среде DMEM (Gibco, США). После проведения подсчета в камере Горяева клетки смешивали в соотношении 1:10 (лимфоцит: миеломный партнер). Часть смеси была высеяна в лунки культуральных 96-луночных планшетов для контроля чувствительности родительской гетерогибридомы к ГАТ и базового уровня антител при скрининге.

Осаждение смеси гибридизуемых клеток было выполнено при 1200 об/мин в течение 10 минут. Супернатант полностью был удален, к клеточному осадку был добавлен 50%-ый раствор ПЭГ 4000, после чего клетки были ресуспендированы. Далее была выполнена инкубация в течение 1 мин и к клеткам медленно по каплям была добавлена бессывороточная среда DMEM (Gibco, США). Осаждение было проведено центрифугированием при 1200 об/мин в течение 10 мин. Супернатант был удален, осадок был ресуспендирован в полной ростовой среде с ГАТ и клетки были высеяны в лунки 96-луночных планшетов с предварительно высеянными перитонеальными макрофагами. Планшеты были выдержены при 37ºС в атмосфере, содержащей 5% CO_2, в течение недели.

Для получения макрофагов в перитонеальную полость мыши был осуществлен ввод 5 мл полной ростовой среды с ГАТ, которые затем были отобраны и разведены этой же средой до объема 50 мл. Выделенные клетки были посеяны в лунки 96-луночного культурального планшета в объеме 100 мкл в лунку. Культивирование осуществлялось в течение 1-3 ч для прикрепления макрофагов к поверхности лунок.

Тестирование клонов гетерогибридом к ГПВБ, полученных на основе человеческих В-лимфоцитов

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 (Всероссийский

научный центр молекулярной диагностики и лечения, ВНЦМДЛ). В иммунологические 96-луночные планшеты было внесено мышиное мАТ 1С5 в концентрации 5 мкг/мл, сорбция осуществлялась при +4°С в течение ночи. Затем лунки планшетов были промыты три раза ФСБ-Т, свободные места связывания были блокированы 0,5 % БСА, и снова три раза промыты ФСБ-Т. Далее была внесена вакцина Рабипур в разведении 1:200, для связывания планшет был помещен в термостат с температурой 37°С на 1 ч. После стадии отмывания в лунки были добавлены супернатанты от клонов гетерогибридом. Визуализация связывания осуществлялась путем добавления в лунки конъюгированого с пероксидазой хрена антитела, направленного к IgG, и окрашивания раствором ТМБ. Реакция пероксидаза-ТМБ была остановлена добавлением 10% H_2SO_4, значения поглощения были получены при длине волны 450 нм.

Тестирование клонов гетерогибридом, отобранных после первичного скрининга, на неспецифическое связывание проводили методом непрямого ИФА с использованием в качестве антигена на подложке БСА.

Клетки, для которых был установлен положительных высокий сигнал, подтверждающий специфическое связывание с ГПВБ, клонировали методом предельных разведений, после чего еще раз тестировали и отбирали стабильные клоны. Клетки гетерогибридомы клонов 6B2 и RabD4 были наработаны в полной ростовой среде. Наработка клеток начиналась в 96-луночных культуральных планшетах с предварительно добавленными в них мышиными перитонеальными макрофагами. Объем культивирования был постепенно увеличен, контролируя антителопродукцию. Из 96-луночных планшетов клетки были переведены в планшеты с лунками больших объемов, на заключительном этапе масштабирования использовались 6-луночные планшеты.

Гликопротеин вируса бешенства

В качестве антигена при иммунохимической характеризации использовали:

1) нативный высокоочищенный ГПВБ, штамм “Внуково-32” [79], предоставленный А.В. Киктенко, ФГУП “Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН”, который является основой при производстве отечественной антирабической вакцины КОКАВ;

2) коммерческий рекомбинантный гликопротеин вируса бешенства штамм ERA (20-459 а.о.) фирмы MyBioSource, США;

3) рекомбинантный гликопротеин вируса бешенства штамм CVS-11 (20-459 а.о.), полученный в данной работе (аминокислотная последовательность: KFPIYTIPDELGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSEFSYMELKVGYISAIKVNGFT CTGVVTEAETYTNFVGYVTTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWKMAGDPRYEESLHNPY PDYHWLRTVRTTKESLIIISPSVTDLDPYDKSLHSRVFPGGKCSGITVSSTYCSTNHDYT IWMPEDPRPRTPCDIFTNSRGKRASKGNKTCGFVDERGLYKSLKGACRLKLCGVLGL RLMDGTWVAMQTSDKTKWCPPDQLVNLHDFHSDEIEHLVVEELVKKREECLDTLESI MTTKSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNRTLMEADAHYKSVRTWNEIIPSKGCLKVG GRCHPHVNGVFFNGIILGPDGHVLIPEMQSSLLQQHMELLKSSVIPLMHPLADPSTVFK EGDEAEDFVEVHLPDVYKRISGVDLGLPNWGKY).

Выделение РНК

Для получения человеческих вариабельных доменов мАТ против ГПВБ с использованием TRIZOL® Reagent (Life Technologies, США) была выделена суммарная РНК из клеток двух линий гетерогибридом 6B2 (120000 клеток) и RabD4 (30000 клеток). Для этого в пробирку с замороженным осадком культуры клеток добавляли 300 мкл TRIZOL® Reagent, перемешивали пипетированием и оставляли на 5 мин при RT для лизиса клеток. В смесь вносили 60 мкл хлороформа (в расчете 0.2 мл хлороформа на 1 мл TRIZOL® Reagent). В течение 15 сек активно перемешивали, после чего инкубировали 2-3 мин при RT. Далее центрифугировали 15 мин при 4°C и 11000 об/мин для разделения суспензии на две фазы. Верхнюю водную фазу с РНК отбирали (~60% от объема TRIZOL® Reagent). Для агрегации и преципитации РНК добавляли 150 мкл изопропанола (в расчете 0.5 мл изопропанола на 1 мл TRIZOL® Reagent), а также 6 мкг гликогена (Thermo Scientific, США) перемешивали на Vortex и инкубировали в течение 10 мин при RT. РНК осаждали с помощью центрифугирования в течение 10 мин при 4°C и скорости 12000 об/мин. Отбирали образовавшийся супернатант и промывали РНК 300 мкл этанола (в расчете 1 мл этанола на 1 мл TRIZOL® Reagent). Осаждали РНК центрифугированием в течение 5 мин при 4ºC и 7500 об/мин. Затем удаляли супернатант, высушивали осадок и растворяли РНК в 5-7 мкл воды, обработанной DEPC, инкубировали раствор в течение 10 мин при 55 – 60°C.

Аналогичным образом была выделена РНК из клеток ВНК-21, зараженных вирусом бешенства штамм CVS-11 для получения рекомбинантного ГПВБ.

Обратная транскрипция и получение специфических нуклеотидных последовательностей, кодирующих целевые белки

С помощью обратной транскриптазы RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, США) и праймеров RT (AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTATTTTTTTTTTTTTTTTTT) и SMRibo (AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCrGrGrG) была синтезирована кДНК для амплификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих VL и VH мАТ. кДНК, кодирующая ГПВБ, была синтезирована с помощью праймера ГПВБ –CVS-11-rev1.

Для амплификации фрагментов ДНК, кодирующих VL и VH мАТ 6B2 и RabD4, были использованы генспецифические праймеры, комплементарные областям константных доменов иммуноглобулина человека (IgM, IgG, к-цепь и λ-цепь) :

1NesHuG: 5’ GTCCTTGACCAGGCAGCCC 3

1NesHuM: 5’ GGAATTCTCACAGGAGACGAGG 3’

1NesHuKap: 5’ GATTTCAACTGCTCATCAGATGG 3’

NesHuLam: 5’GCTCCTCAGAGGAGGG 3’

2NesHuG: 5’ GATGGGCCCTTGGTGGA 3’

2NesHuM: 5’ GTTGGGGCGGATGCAC 3’

2NesHuKap: 5’ AGATGAAGACAGATGGTGCAGC 3’

Нуклеотидная последовательность, кодирующая экстрацеллюлярный домен ГПВБ (20-459 а. о.), была амплифицирована с помощью праймера на начало родного лидерного пептида (ГПВБ-CVS-11-for) и праймера на конец экстрацеллюлярного домена (ГПВБ-CVS-11-rev2):

ГПВБ-CVS-11-for: 5’ ATCTAGCTAGCTAAAAGATGGTTCCTCAGGTTC

ГПВБ-CVS-11-rev1 5’CAGTCTGATCTCACCTCCACTCTTATATGATTC

ГПВБ-CVS-11-rev2 5’ ATACTTTCCCCAGTTCGGGAGACCCA

Амплификация и сборка нуклеотидных последовательностей с помощью ПЦР

Получение нуклеотидных последовательностей, кодирующих цепи мАТ или ГПВБ, объединение их с лидерными пептидами, His-тагом, введение сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции было выполнено с помощью ПЦР. В работе были использованы Tersus и Taq ДНК-полимеразы.

Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез проводили в 1% агарозном геле с использованием 1xTAE буфера и бромистого этидия, добавляемого в гель в концентрации 0,1 мкг/мл. Электрофорез проводили при напряжении 80-100 В, молекулы ДНК визуализировали в УФ свете при длине волны 312 нм с использованием трансиллюминатора EXC-F20.M (Vilber Lourmat, Франция).

Секвенирование нуклеотидных последовательностей

Нуклеотидную последовательность фрагментов определяли на автоматическом секвенаторе в ЗАО Евроген (г. Москва).

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Работа с нуклеотидными и аминокислотными последовательностями и их анализ выполнялись с помощью програмного обеспечения Unipro Ugene (1.9.0) и Gene Runner (5.1.06). С помощью программы Oligos (8.40) подбирались и комбинировались праймеры, определялась температура отжига.

Получение генноинженерных конструкций

Рестрикция. Реакцию проводили в соответствии с рекомендациями производителя Fast Digest ферментов (Thermo Scientific, США). Рестрикционную смесь инкубировали при необходимой температуре в течение 1-2 ч, в случае с ПЦР фрагментами и 15-30 мин в случае с плазмидной ДНК. По завершении рестрикции ферменты инактивировали нагреванием, после чего плазмидную ДНК дополнительно обрабатывали щелочной фосфатазой.

Лигирование. Лигирование было выполнено с помощью фермента Т4 ДНК-лигазы (Thermo Scientific, США) в объеме реакционной смеси равном 20 мкл. Молярное

соотношение вектор/вставка – 1/10. Лигирование проводили в течение 16 – 18 ч при 12 ºС, после чего фермент инактивировали нагреванием.

Переосаждение лигазной смеси с помощью бутанола. Для этого лигазную смесь смешивали с 10-ти кратным избытком по объему бутанола и центрифугировали в течение 30 мин при скорости 14000 об/мин. Отбирали супернатант, к осадку ДНК добавляли 1 мл 70%-го охлажденного этанола. Центрифугировали в течение 5 мин при 14000 об/мин. Удаляли супернатант, подсушивали осадок ДНК при комнатной температуре и растворяли в воде.

Выделение ДНК. Выделение плазмидной ДНК и очистку ДНК из агарозного геля проводили с помощью наборов реактивов PureLink HiPure Plasmid Miniprep/Midiprep Kit (Invitrogen) и NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), соответственно, согласно рекомендациям производителя.

Трансформация *E.coli*. Для трансформации использовались кальциевые компетентные клетки *E.coli* штамма XL1 Blue. 200 мкл клеток, смешанных с 50 – 100 нг плазмидной ДНК инкубировали во льду в течение 30 – 40 мин. Затем переносили в термостат и инкубировали 1.5 мин при температуре 42ºС. После чего клетки снова помещали в лед на 10 мин и добавляли к ним стерильную среду LB до объема 1 мл. Клетки подращивали при 37ºС в течение часа, после чего высевали на чашки с агаризованной селективной средой LB или 2×YT или в пробирки с жидкой средой и инкубировали в течение ночи при 37ºС и 250 об/мин.

Электропорация *E.coli*. Для электропорации использовались предварительно охлажденные кюветы с расстоянием между электродами 0.1 см. На льду размораживали клетки *E.coli* штамма TG1 или XL1 Blue. К 40 мкл суспензии клеток добавляли аликвоту ДНК (0.5 – 4 мкл предварительно очищенной от солей лигазной смеси или 50 – 100 нг плазмидной ДНК) и инкубировали во льду 1 мин. Параметры электропорации: 1.3 – 1.8 кВ для кюветы с зазором ячейки 0.1 см. Смесь клеток и ДНК помещали в холодную электропорационную кювету между электродными пластинами. Проводили один импульс. После электропорации к клеткам добавляли 1 мл среды SOC и переносили в чистую пробирку. Подращивали клетки при 37ºС и 220 об/мин в течение часа, после чего высевали на чашки с агаризованной селективной средой LB или 2YT или в пробирки с жидкой средой и инкубировали в течение ночи при 37ºС и 250 об/мин.

Приготовление химически компетентных клеток

Ночную культуру клеток, выращенную из одной колонии, разводили до OD_{600}=0,1 и подращивали в конечном объеме среды до плотности OD_{600}=0,5. После чего клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в холодном растворе RF1 (20 мл раствора на 50 мл клеточной культуры). Клетки инкубировали на льду в течение 1-1,5 ч, осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об/мин и ресуспендировали в холодном растворе RF2, который добавлялся в расчете 10 мл раствора RF2 на 50 мл клеточной культуры. Клетки инкубировали 20 мин на льду и затем раскапывали аликвоты в предварительно охлажденные пробирки, которые затем хранили при температуре -70 ºС.

Приготовление компетентных клеток для электропорации

Ночную культуру клеток, выращенную из одной колонии, разводили до OD_{600}=0,1 в низкосолевой среде SOB. Далее подращивали клетки до плотности OD_{600} = 0.5 при температуре 37ºС и перемешивании со скоростью 250 об/мин. Охлаждали культуру клеток на льду в течение 20 мин и осаждали центрифугированием в течение 5 мин и 3000 об/мин при 4 ºС. Супернатант удаляли, а клетки ресуспендировали в объеме холодной стерильной воды (Milli-Q), равным объему клеточной культуры. После этого клетки опять осаждали при тех же условиях, удаляли супернатант, а осадок ресуспендировали в холодной воде (Milli-Q) объемом равным ½ от объема изначальной клеточной культуры. Далее снова повторяли этап осаждения клеток, удаления супернатанта и ресуспендировали клетки в воде (Milli-Q) объемом равным ¼ объема клеточной культуры. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин и 4000 об/мин при 4 ºС. Для полного удаления солей осадок клеток ресуспендировали в 10% глицерине объемом равным~ 1/6 от изначального объема клеточной культуры. После этого клетки центрифугировали в течение 15 мин на скорости 4000 об/мин при 4 ºС. Удаляли супернатант. Осадок клеток ресуспендировали в 1-1.3 мл 10% глицерина на 500 мл клеточной культуры. Клетки переносили в предварительно охлажденные пробирки, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70 ºС.

Получение плазмидных конструкций для транзиентной экспрессии новых рекомбинантных мАТ 6B2, 1C5 и RabD4, а также контрольных мАТ CR57 и CR4098

Для наработки полноразмерных мАТ были получены экспрессионные векторы, кодирующие легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC), на основе плазмиды pcDNA 3.4.

Клонирование кодирующих последовательностей генов LC и HC мАТ 6B2, RabD4, 1C5, CR57 и CR4098 против вируса бешенства в вектор pcDNA 3.4 под контроль промотора CMV проводили по схеме, указанной ниже.

Вариабельные домены совместно с нативными лидерными пептидами и последовательностями Козак новых человеческих мАТ против вируса бешенства 6B2 и RabD4 были наработаны методом ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмид, полученных и проверенных путем секвенирования на предыдущем этапе. Праймеры для амплификации содержали области, перекрывающиеся с началом константного домена κ/λ-LC человека или константного домена CH1-CH2-CH3 HC IgG1 человека для их последующего объединения. В результате SOE-ПЦР с использованием внешних праймеров, содержащих сайты узнавания рестриктаз NheI и XhoI, были амплифицированы HC и LC посредством объединения вышеуказанных фрагментов антител.

Вариабельные домены мАТ CR57 и CR4098 были амплифицированы с помощью праймеров, включающих области, перекрывающиеся с началом константного домена κ/λ-LC человека и константного домена CH1-CH2-CH3 HC IgG1 человека, соответственно, с одной стороны, и с 3’-концом лидерного пептида с другой. В результате SOE-ПЦР с использованием внешних праймеров, содержащих сайты узнавания рестриктаз NheI и XhoI, были амплифицированы HC и LC посредством объединения лидерного пептида, вариабельного домена и константного домена человеческого иммуноглобулина. Также на 5’-конец каждой цепи антитела была добавлена последовательность Козак. Праймеры, использованные для сборки LC и HC, приведены в таблице 7.

Таблица 7. Олигонуклеотиды, использованные в полимеразной цепной реакции (ПЦР) для получения LC и HC мАТ, клонируемых в дальнейшем в экспрессионный вектор pcDNA3.4

6B2RV-VL-NheI-	TCAATGCTAGCGGAACCATGGAA	Внешний праймер.

F		Введение NheI-сайта на 5’конец L.ch.
6B2RV-SOE-VL-1a-F	CTGGAGATCAAACGGACTGTGGCT	Стык VL 6B2 с к-цепью.
6B2RV-SOE-VL-1b-R	AGCCACAGTCCGTTTGATCTCCAG	Стык VL 6B2 с к-цепью.
6B2RV-VH-NheI-F	TCAATGCTAGCCTCACCATGGAGTT	Внешний праймер. Введение NheI-сайта на 5’конец H.ch.
6B2RV-SOE-VH-2a-F	ACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAA	Стык VH 6B2 и CH1-CH2-CH3 домена IgG1.
6B2RV-SOE-VH-2b-R	TTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGT	Стык VH 6B2 и CH1-CH2-CH3 домена IgG1.
1C5-NheI-VL-1-F	TCAATGCTAGCCTCAAAATGAAGTTG	Внешний праймер. Введение NheI-сайта на 5’конец L.ch.
1C5HuSOE-VL3a-F	GCTTCCAGCAGTGACATCCAGATGA	Стык лидерного пептида с VL 1C5
1C5HuSOE-VL3b-R	TCATCTGGATGTCACTGCTGGAAGC	Стык лидерного пептида с VL 1C5
1C5HuSOE-VL4a-F	GAAATAAAACGGACTGTGGCTGCAC	Стык VL 1C5 с к-цепью.
1C5HuSOE-VL4b-R	GTGCAGCCACAGTCCGTTTTATTTC	Стык VL 1C5 с к-цепью.
1C5-NheI-VH-3-F	ATCTAGCTAGCTAAAAGATGAGAGTGCT	Внешний праймер. Введение NheI-

		сайта на 5’конец H.ch.
1C5HuSOE-VH1a-F	TGGTATCCTGTCTCGGGTCCAACT	Стык лидерного пептида с VH 1C5
1C5HuSOE-VH1b-R	AGTTGGACCCGAGACAGGATACCA	Стык лидерного пептида с VH 1C5
1C5HuSOE-VH2a-F	CACTGTCTCTGCAGCCTCCACCAAGG	Стык VH 1C5 и CH1-CH2-CH3 домена IgG1.
1C5HuSOE-VH2b-R	CCTTGGTGGAGGCTGCAGAGACAGTG	Стык VH 1C5 и CH1-CH2-CH3 домена IgG1.
RabD4-NheI-VL-1-F	TCAATGCTAGCCTCAAAATGAAGTTG	Внешний праймер. Введение NheI-сайта на 5’конец L.ch.
RabD4SOE-VL2a-F	CACCGTCCTACGTGGACAGCCCAAG	Стык VL RabD4 с λ-цепью.
RabD4SOE-VL2b-R	CTTGGGCTGTCCACGTAGGACGGTG	Стык VL RabD4 с λ-цепью.
RabD4-NheI-VH-F	ATCTAGCTAGCTAAAAGATGAGAGTGCT	Внешний праймер. Введение NheI-сайта на 5’конец H.ch.
RabD4SOE-VH4a-F	CACCGTCTCCTCAgcctccaccaag	Стык VH RabD4 и CH1-CH2-CH3 домена IgG1.
RabD4SOE-VH4b-R	CTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTG	Стык VH RabD4 и CH1-CH2-CH3 домена IgG1.

CR57-NheI-VL-1-F	TCAATGCTAGCCTCAAAATGAAGTTG	Внешний праймер. Введение NheI-сайта на 5’конец L.ch.
CR57SOE-VL1a-F	GCTTCCAGCAGTCAGAGCGCCCTC	Стык лидерного пептида с VL CR57.
CR57SOE-VL1b-R	GAGGGCGCTCTGACTGCTGGAAGC	Стык лидерного пептида с VL CR57.
CR57SOE-VL2a-F	CTTACCGTCCTAGGACAGCCCAAG	Стык VL CR57 с λ-цепью.
CR57SOE-VL2b-R	CTTGGGCTGTCCTAGGACGGTAAG	Стык VL CR57 с λ-цепью.
CR57-VH-NheI-F	TCAATGCTAGCCTCACCATGGAGTT	Внешний праймер. Введение NheI-сайта на 5’конец H.ch.
CR57SOE-VH3a-F	GGTATCCTGTCTCAGGTGCAGCTGG	Стык лидерного пептида и VH CR57.
CR57SOE-VH3b-R	CCAGCTGCACCTGAGACAGGATACC	Стык лидерного пептида и VH CR57
CR57SOE-VH4a-F	GACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAG	Стык VH CR57 и CH1-CH2-CH3 домена IgG1
CR57SOE-VH4b-R	CTTGGTGGAGGCTGAGCTCACGGTC	Стык VH CR57 и CH1-CH2-CH3 домена IgG1
CR4098-NheI-VL-F	TCAATGCTAGCCTCAAAATGAAGTTG	Внешний праймер. Введение NheI-сайта на 5’конец L.ch.

CR4098SOE-VL3a-F	GCTTCCAGCAGTGACATCCAGATGAC	Стык лидерного пептида и VL CR4098
CR4098SOE-VL3b-R	GTCATCTGGATGTCACTGCTGGAAGC	Стык лидерного пептида и VL CR4098
CR4098SOE-VL4a-F	GTGGAAATCAAACGGACTGTGGCTG	Стык VL CR4098 с к-цепью
CR4098SOE-VL4b-R	CAGCCACAGTCCGTTTGATTTCCAC	Стык VL CR4098 с к-цепью
CR4098-NheI-VH-F	ATCTAGCTAGCTAAAAGATGAGAGTGCT	Внешний праймер. Введение NheI-сайта на 5’конец H.ch.
CR4098SOE-VH1a-F	TGGTATCCTGTCTCAGGTGCAGCTGG	Стык лидерного пептида и VH CR4098
CR4098SOE-VH1a-R	CCAGCTGCACCTGAGACAGGATACCA	Стык лидерного пептида и VH CR4098
CR4098SOE-VH2a-F	CGTCTCGAGCGCCTCCACCAAG	Стык VH CR4098 и CH1-CH2-CH3 домена IgG1
CR4098SOE-VH2b-R	CTTGGTGGAGGCGCTCGAGACG	Стык VH CR4098 и CH1-CH2-CH3 домена IgG1
G1Fc-TGA-XhoI-R	CTTCTCGAGTCATTTACCCGGAGACAG	Внешний праймер. Введение XhoI-сайта на 3’конец H.ch.
IgC2Lam-Xho-R-2	CTCTCGAGTCAGCTGCACTCGGTGG	Внешний праймер.

		Введение XhoI-сайта на 3’конец λ-цепи.
CKap-Xho-R	GTCTCGAGCTAACACTCTCCCCTGTTG	Внешний праймер. Введение XhoI-сайта на 3’конец κ-цепи.

Экспрессионные кассеты Lc и Hc мАТ 6B2, RabD4, CR57 и CR4098 были лигированы по сайтам NheI/XhoI в вектор pcDNA3.4.

Экспрессия генов

Для секреторной экспрессии генов, кодирующих рекомбинантные белки (мАТ 1C5, мАТ RabD4, мАТ CR4098, мАТ CR57, ГПВБ), в культуральную среду, были использованы клетки CHO. За 24 ч до трансфекции клетки были пересеяны в концентрации 4×10^6 клеток/мл в колбу Эрленмейера, содержащую 30 мл культуральной среды OptiCHO (Invitrogen, США). Трансфекцию клеток проводили с использованием липофектамина (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя и комбинации очищенных векторных конструкций, содержащих отдельно последовательности ДНК, кодирующие LC и HC целевого антитела или ДНК, кодирующую ГПВБ. Культивирование продолжали в течение 10-14 сут при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 8% CO_2, при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере со скоростью 130 об/мин до снижения количества живых клеток в культуре до уровня 0.3×10^6 клеток/мл. После завершения культивирования клетки осаждали центрифугированием при скорости вращения 1200 об/мин в течение 10 мин, затем супернатант, содержащий целевой белок, центрифугировали в течение 15 мин при скорости вращения 4000 об/мин и стерилизовали раствор мАТ фильтрованием через мембрану с размером пор равным 0.22 мкм. До выделения супернатант хранили при температуре 4°C.

Выделение и очистка белков

Аффинная хроматография с использованием сорбента протеин-А

Очистку гуманизированного мАТ 1С5 проводили методом аффинной хроматографии на протеин-А-сефарозе Mab Select (GE Healthcare, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Целевой белок с колонки элюировали 0.1 М глициновым буфером (pH 3.0), полученные фракции нейтрализовали путем добавления 1 М Tris-HCl (pH 8.0) в соотношении 1/10 часть от объема глицинового буфера.

Гель-фильтрационная хроматография

Гель-фильтрационную хроматографию, аналитическую или препаративную, проводили на колонке Superdex 200-10/300-GL (GE Healthcare, США) в 100 мМ Tris-HCl- буфере (pH 8.0), содержащем 150 мМ NaCl.

Металл-аффинная хроматография для ГПВБ

Рекомбинантный ГПВБ (а.о. 20-459) из культуральной жидкости был выделен с помощью Ni^{+2}-ИДА сефарозы (GE Healthcare, США). ИДА-сефарозу вносили в колонку и промывали 10-ти кратным объемом воды. Далее иммобилизовали ионы металла, добавляя 1/5 часть от объема носителя 0.2 М $NiSO_4$ с последующей промывкой 10-ти кратным объемом воды. После чего смешивали с супернатантом и инкубировали в течение ночи при 4 ºС и перемешивании. Содержание некоторых солей в супернатанте было доведено до следующих конечных концентраций (20 мМ NaPh или 15 мМ Na_2HPO_4, 5 mM NaH_2PO_4, 500 мМ NaCl), значение pH составляло 8.0. Смесь наносили на колонку, носитель промывали 20 мМ NaPh, 500 мМ NaCl, pH 7.8. Связанный белок элюировали 300 мМ имидазолом в ФСБ.

Электрофорез белков в SDS-ПААГ

Электрофоретическое разделение белков выполняли по стандартной методике в 12% SDS-ПААГ [80]. Образцы наносили в двух вариантах: в буфере с β-меркаптоэтанолом и без него. Электрофорез проводили с использованием прибора Mini Protean® 3 Cell (BioRad, США) в трис-глициновом буфере при постоянном токе 10 мА на один гель.

Иммунохимическая характеризация мАТ против ГПВБ

Иммуноблоттинг

Способность мАТ 1C5, мАТ CR4098, мАТ RabD4, мАТ CR57 взаимодействовать с ГПВБ и вирусными частицами вакцинных штаммов вируса бешенства исследовали методом иммуноблотинга. На первом этапе проводили электрофоретическое разделение ГПВБ и вирусных частиц (вакцина Рабипур, Индия) с помощью электрофореза в 12% SDS-ПААГ в невосстанавливающих условиях без кипячения и в восстанавливающих условиях, с добавлением дитиотреитола с кипячением. Затем осуществляли электрофоретический перенос разделенных белков из геля на твердую подложку, в качестве которой использовали нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0.45 мкм (ADVANTEC, Япония). Свободные места на мембране блокировали 5% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ФСБ в течение ночи при температуре 4°C, и три раза промывали ФСБ-Т (10 мМ K_2HPO_4, pH 7.5, 0.145 М NaCl, 0.05% Tween20). Далее нитроцеллюлозную мембрану помещали в раствор каждого из исследуемых мАТ с концентрацией 10 мкг/мл, отрицательный контроль (полученное в нашей лаборатории мАТ против интерлейкина-17А) и инкубировали 1 ч при температуре 37°C. После этого мембрану промывали три раза ФСБ, добавляли пероксидазный конъюгат антивидовых поликлональных антител против IgG человека и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C. Далее мембрану промывали пять раз раствором ФСБ-Т, содержащим 0.2% Tween20, добавляли субстрат (3,3-диаминобензидин, 4-хлор-1-нафтол и перекись водорода), и инкубировали 10–15 мин, после чего останавливали реакцию, промывая мембрану водой.

Непрямой ИФА

Непрямой ИФА использовали для определения способности мАТ 1C5 и мАТ RabD4 взаимодействовать с ГПВБ в сравнении с контрольными мАТ CR57 и мАТ CR4098. Планшет покрывали раствором ГПВБ (10 мкг/мл) в ФСБ, блокировали 5% раствором БСА в ФСБ, после чего добавляли исследуемые мАТ. Планшет инкубировали с мАТ в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего промывали раствором ФСБ-Т, содержащим 0.05% Tween20, пять раз. Затем на планшет наносили раствор антивидовых поликлональных антител против человеческого иммуноглобулина, конъюгированных с пероксидазой хрена (ВНЦМДЛ, Россия). Планшет промывали раствором ФСБ-Т, содержащим 0.05% Tween20, семь раз, после чего в каждую лунку добавляли проявляющий субстрат тетраметилбензидин (ТМБ). После развития окраски реакцию останавливали 10% раствором серной кислоты. Оптическое поглощение

измеряли на спектрофотометре Microplate Reader 680 (BioRad, США) при длине волны 450 нм.

Определение Кд для комплекса мАТ-ГПВБ

Равновесную Кд комплекса мАТ с ГПВБ определяли согласно методу Фриге и др. [81] с использованием уравнения Клотца[82]:

Ao/(Ao – A) = 1 + 1/aKd, где

Ao – оптическое поглощение (λ450) раствора антитела в отсутствие антигена,

A – оптическое поглощение (λ450) раствора свободных антител в смеси антиген антитело,

a – молярная концентрация антигена, М.

На первом этапе в результате проведения непрямого ИФА была получена калибровочная кривая, позволяющая установить диапазон концентраций для каждого из мАТ, при которых зависимость оптического поглощения (А450) от разведения мАТ имеет близкий к линейному вид, что позволяет использовать упрощенный метод для расчета Kd. Далее для постановки конкурентного ИФА в рамках определения Kd была выбрана концентрация мАТ 1С5 (10 нг/мл), мАТ RabD4 (400 нг/мл), мАТ CR57 (20 нг/мл), мАТ CR4098 (20 нг/мл) и разведения ГПВБ для мАТ 1С5, мАТ CR4098, мАТ CR57 (8; 4; 2; 1; 0.5 и 0.025 мкг/мл) и разведения ГПВБ для мАТ RabD4 (4; 2; 1; 0.5, 0.25 и 0,125 мкг/мл), соответствующие линейному участку калибровочной кривой. На иммунологический планшет, блокированный 0.25% раствором желатина, был нанесен ГПВБ в серийных двукратных разведениях, в концентрации от 16 до 0.125 мкг/мл (каждое разведение было внесено на планшет в трех повторах), а также были оставлены лунки без ГПВБ, содержашие только ФСБ, по которым определяли значение Ao. В каждую лунку затем были добавлены образцы мАТ до приведенной выше конечной концентрации. Планшет с образцами выдерживали в течение 2 ч при комнатной температуре до установления равновесия, после чего смеси антиген-антитело были переносены на другой планшет, где заранее был сорбирован ГПВБ в концентрации 10 мкг/мл. Далее был проведен непрямой ИФА для определения концентрации свободных антител. Эксперимент был осуществлен с использованием нативного ГПВБ и пероксидазного коньюгата, специфичного к молекуле IgG человека (ВНЦМДЛ, Россия).

Измерение концентрации

Концентрацию целевого белка определяли спектрофотометрически на приборе NanoPhotometer P300 (IMPLEN, Германия).

Масс-спектрометрический анализ мАТ

Для проведения масс-спектрометрического анализа мАТ разделяли в 10% ПААГ-SDS по Лэммли. После разделения кусочки геля интересующих белковых полос размером около 2 мм^3 вырезали стерильным скальпелем. Проводили триптический гидролиз белков и подготовку образцов. Получение масс-спектров осуществляли на масс-спектрометре Ultraflex TOF/TOF BRUKER (Германия). Идентификацию белков по «пептидному фингерпринту» осуществляли при помощи программы Bruker Daltonics BioTools 3.1.

Определение участка связывания ГПВБ мАТ 1С5 и мАТ RabD4 с помощью конкурентного ИФА

мАТ CR57, CR4098, RabD4 и 1С5 конъюгировали с пероксидазой хрена периодатным методом [83]. ГПВБ сорбировали в концентрации 10 мкг/мл в ФСБ в течение ночи при температуре 4°С, затем планшет промывали ФСБ-Т. Антитела титровали в планшете, начиная с концентрации 10 мкг/мл, используя трехкратные разведения. К ним добавляли пероксидазные конъюгаты антител (мАТ –ПХ) с постоянной концентрацией. Конъюгаты антител предварительно титровали в прямом ИФА, по результатам которого выбирали оптимальные разведения. Смесь антител с конъюгированными антителами переносили на планшет с ГПВБ, и инкубировали 1 ч при температуре 37°С. После этого планшет промывали раствором 0.05% ФСБ-Т пять раз и добавляли раствор субстрата ТМБ. Реакцию останавливали 10% раствором серной кислоты. Оптическое поглощение измеряли на спектрофотометре Multiscan (Thermo Scientific, США) при длине волны 450 нм. Кривые конкуренции строили по зависимости B/Bo от концентрации неконъюгированных антител для каждого конъюгата, где B – оптическое поглощение в присутствии конкурирующего антитела, Bo – оптическое поглощение при использовании конъюгата без добавления конкурирующего антитела.

Оценка антирабической вируснейтрализующей активности мАТ

Изучение специфической вируснейтрализующей активности мАТ 1С5 и мАТ RabD4 проводили в лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф.

Гамалеи", аккредитованной ANSES (Nancy, France) Laboratory for Rabies and Wildlife OIE, по бешенству и лиссавирусам. Определение антирабической активности осуществляли с помощью флюоресцентного вируснейтрализующего теста (fluorescent antibody virus neutralization, FAVN) согласно [84].

Тест FAVN проводили с использованием стандарта ВОЗ антирабического иммуноглобулина, International Laboratory For Biological Standards, Copenhagen, Denmark: Second International Standard for Rabies Immunoglobulin (30 IU/ml of Rabies Antibodies in the amp.) и Стандарта European Pharmacopoeia Reference Standard Human rabies immunoglobulin BPR, Strasburg. Batch: 1.1, Id: 004X14, 91 IU/ml.

Титрование вируса бешенства штамм CVS-11 (ATCC VR 959) проводили с использованием клеток BHK-21 C13 (ATCC CCL-10). Для этого десятикратные разведения вируса от 10^{-1} до 10^{-12} (на каждое разведение по 6 повторов) вносили в лунки с посеянными накануне клетками BHK-21 (2×10^4 клеток в лунке) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO2. Затем в каждую лунку добавляли по 200 мкл клеточной культуральной среды DMEM, содержащей 5% ФТС, и помещали планшет на 3 дня в термостат (37°C, 5% CO2). Далее клетки окрашивали с помощью меченного флюоресцеинизотиоцианатом (FITC) мАТ (Fujirebio Diagnostics, США), инфекционный титр вычисляли с использованием формулы Спирмена-Кербера, приведенной ниже.

Тестируемые антитела и вирус бешенства штамм CVS-11 в количестве 100 $ТЦД_{50}$ (ATCC VR 959) инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO_2, после чего эта смесь была использована для заражения клеток BHK-21 C13 (ATCC CCL-10) в количестве 2×10^4 клеток в каждой лунке. Плашки инкубировали в течение 48 ч при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO_2, после чего удаляли культуральну среду DMEM, лунки промывали ФСБ и фиксировали клетки с помощью 80% ацетона. Окрашивание проводили путем добавления меченного флюоресцеинизотиоцианатом (FITC) антирабического мАТ (Fujirebio Diagnostics, США). После 30 мин инкубации при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO_2, лунки были дважды промыты ФСБ. Результат анализа учитывали с помощью флюоресцентной микроскопии, расчеты были выполнены по формуле Спирмена-Кербера [85]:

$$\text{lg (конечное разведение)} = -(x_0 - \frac{d}{2} + d\Sigma\frac{r_i}{n_i}),$$

x0 = –(lg наименьшего разведения антитела, при котором во всех лунках наблюдается сигнал при окрашивании меченным FITC антирабическим антителом (положительные лунки)),

d = lg этапа разведения,

ni = количество воспроизведений,

ri = количество положительных лунок.

Сравнение полученных значений титров испытуемых сывороток с титром положительной стандартной сыворотки позволяет выразить титры испытуемых сывороток в международных единицах (МЕ/мл), которые в дальнейшем были пересчитаны с учетом концентраций исследуемых образцов и представлены в МЕ/мг для корректного сравнения активности образцов.

Определение вируснейтрализующей активности в интрацеребральном тесте на мышах Balb/c с использованием вируса бешенства штамм CVS-11

В работе использовали штамм CVS-11 вируса бешенства, 4-й пассаж от тест-штамма CVS-11, полученного из ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора. Титры вируса в мозговой суспензии составляли 7,0 log $ЛД_{50}$/0,03 мл. Исследования проводили на мышах линии Balb/c массой 10-12 г., находящихся на стандартном рационе. Мыши поступили из питомника Филиал «СТОЛБОВАЯ» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Лабораторные животные до начала исследования содержались 6 дней для адаптации при групповом содержании в клетках. В каждой клетке площадью S=1126,25 $см^2$ содержали по 10 животных одного пола, площадь пола в клетке содержания для одного животного составила 112,6 $см^2$ (минимально допустимая площадь 40 $см^2$). Во время этого периода у животных каждый день контролировали клиническое состояние путем визуального осмотра. Животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями в экспериментальные группы включены не были.

Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы. Для исключения влияния предпочтений исследователя на формирование экспериментальных групп, отбор животных

осуществлялся при помощи метода модифицированной блочной рандомизации. Для этого всех поступивших из питомника животных случайным образом помещали в ячейки блока рандомизации (число ячеек блока рандомизации кратно числу групп в эксперименте). Далее, пользуясь генератором случайных чисел (статистическая программа Statistica 6.0), получали перечень данных, содержащий номера ячеек с животными и соответствующие им номера групп, куда в дальнейшем были размещены животные.

Маркировка клетки кодировала пол животных, породу, дату начала введения препаратов, название группы. Каждому отобранному в исследование животному был присвоен индивидуальный номер, который наносился несмываемым маркером на хвост животного.

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с Принципами надлежащей лабораторной практики (ГОСТ Р 53434-2009), СанПиН №1045-73 и «Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных» [86], а также с правилами, утвержденными МЗ СССР 06.07.73 г., по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

В период адаптации и эксперимента животные были размещены в металлических клетках, группами по 6 особей одного пола, на подстиле. Площадь пола в клетке содержания для одного животного составила 225 $см^2$ (минимально допустимая площадь 40 $см^2$).

Кормление животных проводилось на основании «Санитарных правил по содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденных МЗ СССР 06.07.73 г. и приказа МЗ СССР №755 от 12.08.77 г. «Корм для содержания лабораторных животных» ПК-120-1, приготовленный по ГОСТ Р 50258-92 в соответствии с нормами, утвержденными приказом МЗ СССР №755 от 12.08.77 г. давали ad libitum в кормовое углубление стальной решетчатой крышки клетки. Животным давалась вода, очищенная, нормированная по органолептическим свойствам, по показателям pH, сухого остатка, восстанавливающих веществ, диоксида углерода, нитратов и нитритов, аммиака, хлоридов, сульфатов, кальция и тяжелых металлов на основании ГОСТ 51232-98 «Вода питьевая. Общие требования к организации и методам

контроля качества». Вода в стандартных поилках со стальными крышками-носиками, давалась ad libitum.

В качестве подстила использовали древесные гранулы 6 мм (ООО «ЗооСПб», Россия). Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (18-22°С и относительной влажности воздуха 50-70%), NH_3=0,001 мг/мл, CO_2=0,1%. Световой режим составлял 12 ч света и 12 ч темноты. Устанавливался режим проветривания, обеспечивающий около 15 объемов помещения в час. Температура и влажность воздуха регистрировались ежедневно. Никаких существенных отклонений этих параметров в период адаптации и в ходе эксперимента не произошло.

Перед проведением реакции нейтрализации определяли титр вируса, для чего готовили десятикратные разведения 10 % суспензии мозга мышей, зараженной штаммом CVS-11 вируса бешенства, на воде для инъекций с добавлением 2% сыворотки крови лошади, инактивированной в течение 30 мин при 56 °С.

Далее нейтрализацию вируса антителами проводили при температуре 6°С в течение 18 ч. Заражение проводили интрацеребрально мышам линии Balb/c, весом (10±1) г по 0,03 мл из расчета по 6 мышей на каждое разведение испытуемого препарата и международного стандарта. Срок наблюдения за мышами составлял 14 сут после заражение вирусом. При оценке результатов опыта учитывали мышей, заболевших или павших с 5 по 14 сутки. Расчет титра вируса проводили по методу Reed и Munch [87].

Испытуемый образец мАТ RabD4 разводили водой 1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:8000 и 1:16000 (конечные разведения составят 1:2000; 1:4000; 1:8000; 1:16000 и 1:32000). Международный стандарт (предварительно разведенный в 1 мл воды), далее титровали 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 и 1:6400 соответственно конечные разведения составили 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 и 1:12800.

Испытуемый образец мАТ 1С5 разводили дистиллированной водой 1:1000; 1:3000; 1:9000; 1:17000 и 1:81000 (конечные разведения составят 1:2000; 1:6000; 1:18000; 1:54000 и 1:162000). Международный стандарт (предварительно разведенный в 1 мл дист. воде), далее титровали 1:400, 1: 800, 1:1600, 1:3200 и 1:6400 соответственно конечные разведения составили 1:800, 1: 1600, 1:3200, 1:6400 и 1:12800.

К каждому разведению добавляли 1:1 рабочее разведение вируса, содержащего от 100 до 1000 LD50/0,03 мл. Одновременно проводили повторное определение $ЛД_{50}$

вируса по методике, описанной выше. Полученные пробы инкубировали при температуре 6°С в течение 18 ч.

Активность исследуемых препаратов, выраженную в международных единицах (МЕ), рассчитывали по формуле:

Y=A/B *n, где

Y – активность исследуемого препарата (в МЕ)

A – обратная величина титра препарата

B – обратная величина титра ОСО

n – активность стандарта в.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИОННОЙ КОНСТРУКЦИИ, КОДИРУЮЩЕЙ ПОЛНОРАЗМЕРНОЕ ГУМАНИЗИРОВАННОЕ мАТ 1С5

Ранее нашими коллегами во Всероссийском научном центре молекулярной диагностики и лечения был создан гуманизированный аналог в виде Fab-фрагмента исходного мышиного мАТ 1С5 к ГПВБ [65]. Гуманизация была проведена методом пересадки гипервариабельных участков (CDRs) мышиного мАТ на каркасные области (FRs) человеческого антитела [88], [76]. Гуманизированное мАТ 1С5 было получено в виде Fab и $F(ab')_2$ фрагментов в результате экспрессии в дрожжевых клетках Pichia pastoris GS115.

Хотя фрагменты антител могут рассматриваться как альтернатива полноразмерным человеческим мАТ ввиду более простого производственного процесса и меньшей себестоимости, их применение ограничивается укороченным периодом полувыведения, а также отсутствием Fc-области, что исключает возможность активации механизма антителозависимой клеточной цитотоксичности [89]. При этом есть данные об отсутствии или значительном снижении нейтрализующей активности у моновалентных форм фрагментов антител [90], [91]. Также с учетом того, что известные перспективные мАТ CR57 (Crucell), мАТ CR4098 (Crucell) и мАТ RABV1 (Serum Institute of India) – это полноразмерные молекулы IgG, логическим продолжением работы стало получение полноразмерного гуманизированного мАТ 1С5 в качестве нового кандидата для экстренной постэкспозиционной профилактики бешенства у людей [92].

Для получения VH и VL гуманизированного мАТ 1С5 было решено использовать метод химико-ферментативного синтеза. Данный метод заключается в химическом синтезе олигонуклеотидов, с последующим их объединением в цельный фрагмент ДНК с помощью ферментативных методов. Олигонуклеотиды, как правило, конструируются таким образом, что при их отжиге (комплексообразовании друг с другом) образуется нековалентная структура с перекрыванием областей стыковки соседних олигонуклеотидов. Дальнейшая достройка одноцепочечных участков обеспечивается работой высокоточных термостабильных полимераз. Принцип химико-ферментативного синтеза генов вариабельных доменов антител представлен на рисунке 3, а результаты сборки VL на примере мАТ 1С5 приведены на рисунке 4.

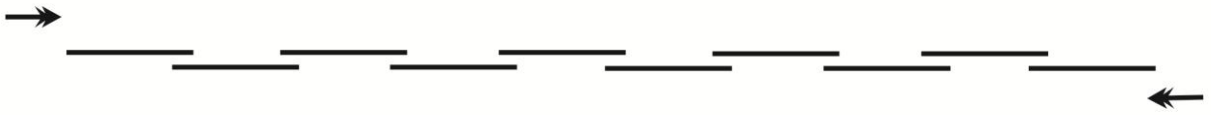

Рисунок 3. Схема синтеза фрагментов ДНК, кодирующих VL и VH с помощью перекрывающихся олигонуклеотидов

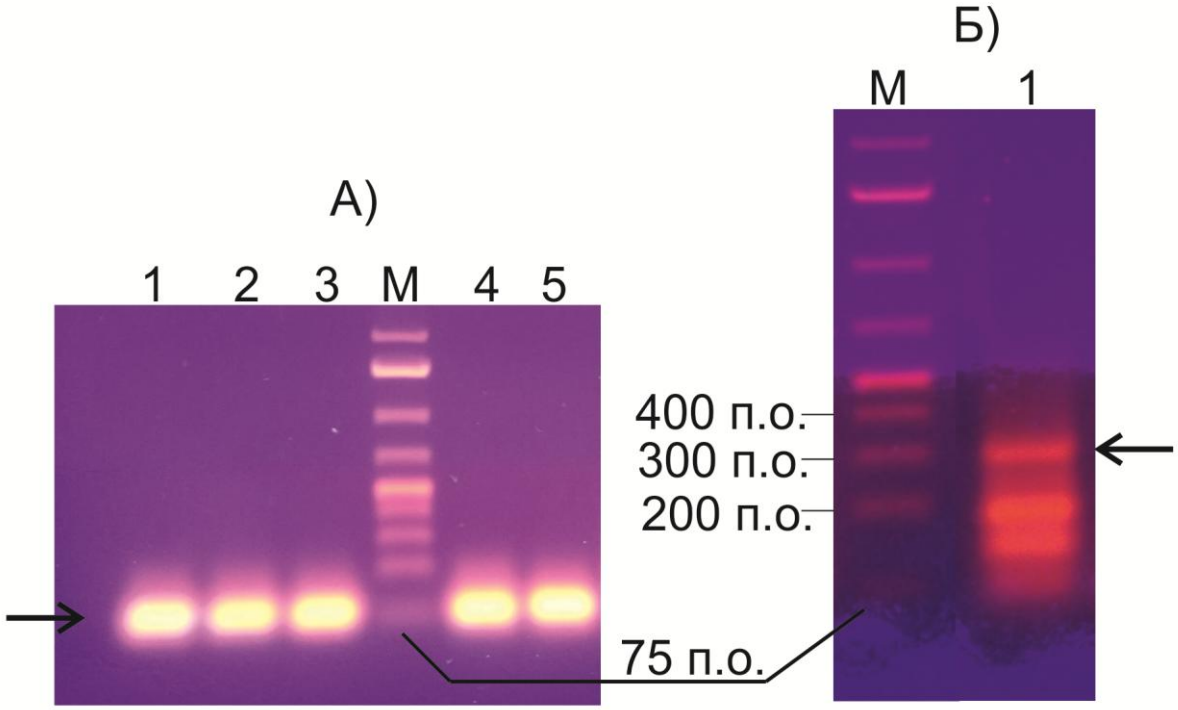

Рисунок 4. А) Электрофореграмма попарно объединенных олигонуклеотидов дял сборки VL, стрелка указывает на димеры; Б) электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации VL мАТ 1С5, стрелка указывает на VL=324 п.о. 1%-й агарозный гель. М – маркеры молекулярной массы (Thermo Fisher Scientific, 1kb+ ladder)

Для создания полноразмерного мАТ 1С5 был выбран изотип HC IgG1 и к – для LC. Стоит отметить, что подавляющее число терапевтических препаратов антител приходится на долю IgG, а именно изотипа IgG1 [93]. 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 [94]. Антитела, относящиеся к изотипу IgG1, обеспечивают антителозависимую клеточную цитотоксичность и активацию системы комплемента – механизмы, необходимые для

вирусной нейтрализации. Также антитела IgG1-изотипа характеризуются длительным временем полужизни в кровотоке, что делает их более пригодными для терапевтического применения, чем, например, антитела IgG3-изотипа [95].

Для получения экспрессионных конструкций нуклеотидные последовательности фрагментов ДНК вариабельных и константных участков мАТ 1С5 (Ск или СН1-СН2-СН3 IgG1, для LC и HC, соответственно) были амплифицированы и объединены с помощью SOE-PCR.

ПОЛУЧЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ мАТ К ГПВБ

Учитывая значительную антигенную специфичность различных вариантов вируса бешенства и мутационную изменчивость, а также рекомендацию ВОЗ о замещении лошадиного или человеческого поликлонального иммуноглобулина не отдельными мАТ, а комбинацией мАТ к различным эпитопам вирусного гликопротеина, следующим этапом нашей работы явилось получение новых антител в дополнение к мАТ 1С5. Получение мАТ, которые в дальнейшем могут войти в состав нового коктейля на основе 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 были выделены и заморожены три аутологичных клеточных субпопуляции: 4,1 млн CD4+ Т-лимфоцитов; 2,8 млн В-лимфоцитов; 3 млн моноцитов. 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 необходимо было получить сначала дендритные клетки [96], а потом «нагрузить» их антигеном – ГПВБ.

Было получено 170 тысяч зрелых дендритных клеток, нагруженных ГПВБ, которые были использованы для стимуляции выделенных В-лимфоцитов. Также для продления жизни В-клеток на следующем этапе на их основе были созданы гетерогибридомы.

Как правило, гибридизация клеток разного видового происхождения приводит к образованию генетически нестабильных гибридов [97], поэтому предварительно была получена гетерогибридома человек-мышь, со временем утратившая способность к антителопродукции. И уже данная, ничего не продуцирующая гетерогибридома была использована для соматической гибридизации с иммунными В-лимфоцитами [98], [99].

Клетки гетерогибридом к ГПВБ, полученные на основе человеческих В-лимфоцитов, были рассеяны в три 96-луночных иммунологических планшета. После культивирования клеток в течение 7 дней при 37ºС в атмосфере, содержащей 5% CO_2, был осуществлен скрининг клонов на способность продуцировать мАТ к ГПВБ, результаты которого приведены на рисунке 5. При этом не было обнаружено роста клеток в тех лунках, куда были высеяны клетки контрольной «пустой» гетерогибридомы человек-мышь, которая использовалась в качестве миеломного партнера. Отсутствие роста клеток в этих контрольных лунках свидетельствует о 100% чувствительности к ГАТ родительской гетерогибридомы.

А)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,111	0,093	0,322	0,282	0,086	0,091	0,108	0,077	0,112	0,086	0,101	0,115
B	0,087	0,102	0,06	0,066	0,066	0,074	0,068	0,069	0,101	0,074	0,073	0,313
C	0,06	0,062	0,06	0,056	0,055	0,056	0,055	0,06	0,074	0,056	0,062	0,089
D	0,067	0,074	0,059	0,62	0,055	0,054	0,062	0,05	0,055	0,084	0,061	0,124
E	0,083	0,062	0,056	0,052	0,05	0,052	0,052	0,049	0,056	0,057	0,061	0,075
F	0,094	0,123	0,054	0,058	0,057	0,065	0,062	0,059	0,072	0,062	0,066	0,09
G	0,078	0,065	0,066	0,065	0,129	2,216	0,057	0,068	0,063	0,06	0,064	0,097
H	0,102	0,077	0,075	0,069	0,075	0,07	0,073	0,069	0,068	0,077	0,092	0,106

Б)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,125	0,133	0,897	0,164	0,162	0,134	0,096	0,104	0,109	0,126	0,169	0,116
B	0,131	0,157	0,277	0,145	0,238	0,112	1,396	0,105	0,141	0,179	0,107	0,105
C	0,129	0,64	0,13	0,239	0,224	0,242	0,1	0,102	0,15	0,105	0,123	0,1
D	0,123	0,106	0,715	0,351	0,125	0,408	0,109	0,105	0,105	0,101	0,101	0,095
E	0,235	1,436	0,114	0,125	0,109	0,189	0,136	0,161	0,113	0,227	0,229	0,11
F	0,126	0,248	0,121	1,536	0,122	0,18	0,103	0,105	0,564	0,109	0,109	0,128
G	1,065	0,16	0,641	0,169	0,123	0,138	0,117	0,122	0,105	0,106	0,113	0,117
H	0,174	0,251	0,131	0,206	0,119	0,154	0,123	0,115	0,237	0,127	0,124	0,135

В)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,129	0,129	0,134	0,117	0,097	0,099	0,121	0,133	0,102	0,109	0,106	0,132
B	0,108	0,117	0,096	0,102	0,1	0,096	0,094	0,099	0,101	0,103	0,1	0,115
C	0,11	0,102	0,124	0,123	0,089	0,126	0,084	0,093	0,086	0,095	0,094	0,123
D	0,348	0,104	0,121	0,091	0,088	0,219	0,089	0,088	0,089	0,093	0,104	0,124
E	1,122	0,096	0,097	0,109	0,092	0,1	0,125	0,11	0,363	0,121	0,095	0,123
F	0,12	0,127	0,124	0,874	0,104	0,107	0,104	0,1	0,124	0,141	0,098	0,131
G	0,131	0,1	0,137	0,109	0,113	1,213	0,1	0,125	0,345	0,134	0,107	0,278
H	0,154	0,143	0,149	0,141	0,177	0,136	0,133	0,145	0,119	0,191	0,128	0,153

Рисунок 5. Тестирование супернатантов клонов гетерогибридом к ГПВБ (А, Б, В). Зеленым цветом отмечены лунки, клоны гибридом из которых были взяты для

культивирования. Желтым цветом отмечены лунки, в которые были внесены клетки родительской гетерогибридомы в качестве отрицательного контроля

По результатам первичного скрининга были отобраны клоны, которым соответствовал высокий уровень сигнала в ИФА с использованием вакцины Рабипур, указывающий на специфическое взаимодействие продуцируемых клонами гетерогибридом мАТ. Все отобранные клоны были клонированы методом предельных разведений, после чего был проведен новый раунд тестирования, включающий проверку на неспецифическое взаимодействие с БСА. По результатам данных экспериментов часть клонов были на этом основании исключены из работы. Некоторые клоны в процессе культивирования утратили способность к антителопродукции или их невозможно было нарастить в достаточном объеме для выделения генетического материала. Таким образом, в итоге удалось отобрать два стабильных клона: 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 (рисунок 6) и получена кДНК, на матрице которой с помощью генспецифических праймеров амплифицированы нуклеотидные последовательности, кодирующие VL и VH мАТ RabD4 и мАТ 6B2.

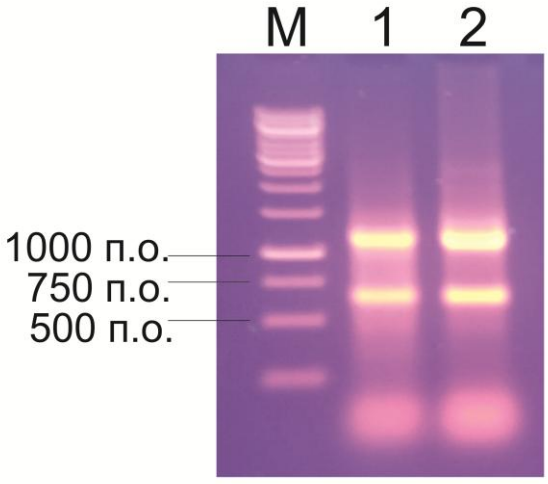

Рисунок 6. Электрофореграмма разделения в агарозном геле суммарной РНК, выделенной из клеток гетерогибридом RabD4 (1) и 6B2 (2). М – маркеры молекулярной массы (Thermo Fisher Scientific, 1kb ladder)

При амплификации фрагментов, кодирующих VH и VL антитела был использован набор ген-специфических праймеров, комплементарных областям константных доменов различных подклассов. При этом ПЦР-фрагменты необходимой длины (≈530 п.о. для фрагментов LC, и ≈620 п.о. для фрагментов HC антитела) обнаруживались только в реакционной смеси, содержащей праймеры, соответствующие изотипу мАТ.

MALDI АНАЛИЗ ДЛЯ мАТ 6B2 И RABD4

Для подтверждения соответствия аминокислотной последовательности, установленной на основании полученных нуклеотидных последовательностей в результате работы с РНК (рисунки 7-10), выделенной из соответствующей линии клеток гетерогибридом, и мАТ, продуцируемого этими клетками, был использован метод время-пролетной масс-спектрометрии с ионизацией MALDI. Аминокислотные последовательности вариабельных доменов были картированы в соответствии с номенклатурой Kabat [100].

1 EVQLLESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFS NHAMSWVRQA PGKGLEWIST

51 ISGSGGRTYY TDSVAGRFTI SRDNSEYTLY LQMNSLTAED TAVYSCARDI

101 IPLAGTGLDY WGQGTLVTVS S

Рисунок 7. Аминокислотная последовательность VH мАТ RabD4 к ГПВБ (121 амк). 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 8. Аминокислотная последовательность VL мАТ RabD4 к ГПВБ (112 амк). 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 9. Аминокислотная последовательность VH мАТ 6B2 к ГПВБ (131 амк). 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 10. Аминокислотная последовательность VL мАТ 6B2 к ГПВБ (109 амк). Красным цветом выделены CDR-участки в соответствии с номенклатурой Kabat

В результате сопоставления выявленных с помощью масс-спектрометрии пептидов, полученных после трипсинолиза мАТ, выделенных напрямую из гетерогибридом, и протранслированной нуклеотидной последовательности соответсвующего мАТ, были выявлены идентичные последовательности аминокислот, что подтвердило соответствие выделенных фрагментов ДНК исходным антителам.

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

Транзиентная система экспрессии в CHO-клетках позволяет получать за короткий промежуток времени терапевтические антитела в количестве, достаточном для иммунохимического анализа, определения аффинности и изучения нейтрализующей активности. Поэтому человеческие 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 (для LC – CTCAAA, для HC – TAAAAG), важная для инициации трансляции (рисунок 11).

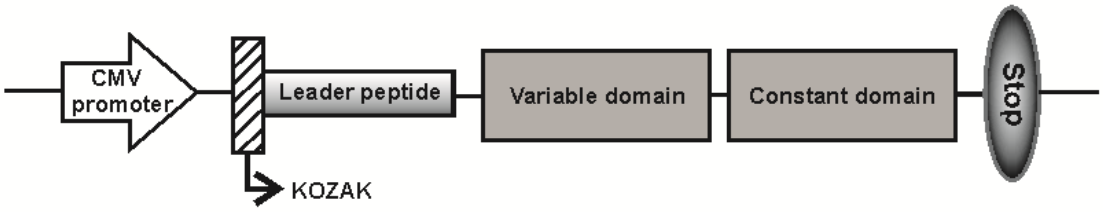

Рисунок 11. Схема экспрессионной кассеты для получения полноразмерных мАТ в CHO-клетках в рамках транзиентной экспрессии

Клонирование кодирующих последовательностей генов LC и HC мАТ 6B2, мАТ RabD4, мАТ 1C5, мАТ CR57 и мАТ CR4098 против вируса бешенства в вектор pcDNA 3.4 под контроль промотора CMV проводили по схеме, указанной ниже.

Вариабельные домены совместно с нативными лидерными пептидами и последовательностями Козак новых человеческих антител против вируса бешенства 6B2 и RabD4 были наработаны с использованием в качестве матрицы плазмид, полученных и отсеквенированных на предыдущем этапе. Праймеры для амплификации содержали области, перекрывающиеся с началом константного домена κ/λ-LC человека или константного домена CH1-CH2-CH3 HC IgG1 человека, для их последующего объединения. В результате SOE-ПЦР с использованием внешних праймеров, содержащих сайты узнавания рестриктаз NheI и XhoI, были амплифицированы HC и LC посредством объединения вышеуказанных фрагментов антител. В процессе конструирования мАТ 6B2 была произведена замена исходного изотипа IgM на IgG1.

Вариабельные домены мАТ 1C5, мАТ CR57 и мАТ CR4098 были амплифицированы с помощью праймеров включающих области, перекрывающиеся с началом константного домена κ/λ-LC человека и константного домена CH1-CH2-CH3 HC IgG1 человека, соответственно, с одной стороны, и с 3’-концом лидерного пептида с другой. В результате SOE-ПЦР с использованием внешних праймеров, содержащих сайты узнавания рестриктаз NheI и XhoI, были амплифицированы HC и LC посредством объединения лидерного пептида, вариабельного домена и константного домена человеческого иммуноглобулина. Для мАТ 1C5, мАТ CR57 и мАТ CR4098 были взяты следующие лидерные пептиды, при использовании которых наблюдаются более высокие выходы целевых белков: для LC – ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGCAG T (MKLPVRLLVLMFWIPASSS),

для HC – ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTGGCTGTTCACAGCCTTTCCTGGTATCCTGTCT (MRVLILLWLFTAFPGILS). На рисунке 12 приведены результаты конструирования и амплификации HC и LC на примере мАТ 1C5.

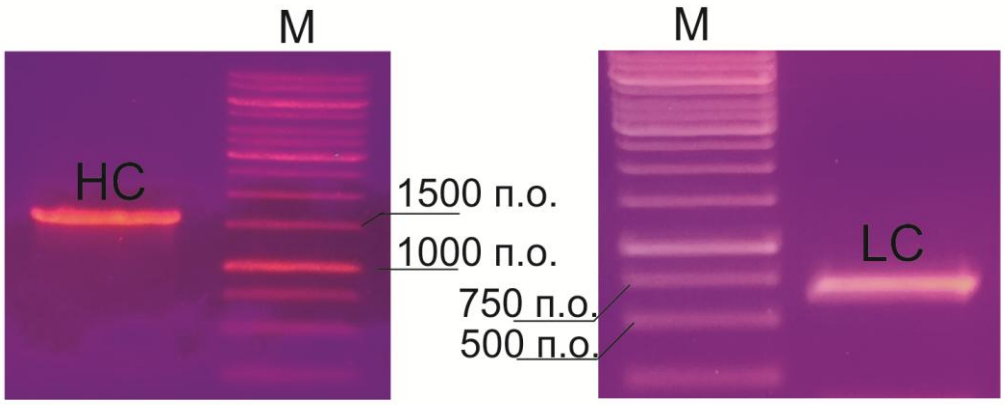

Рисунок 12. Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификаций HC и LC мАТ 1C5, полученные в результате объединения вариабельных доменов с лидерными пептидами и константными доменами (1% агарозный гель)

Полученные ПЦР-фрагменты легкой и тяжелой цепей, включающие лидерные петиды и фрагменты Козак, были очищены из геля с помощью набора (Macherey Nagel, Германия) и клонированы в вектор pcDNA 3.4 (Invitrogen, США) по сайтам NheI/XhoI (Fast Digest, Fermentas, США). Рестрикция вектора и вставок проводилась при 37ºС в течение времени, рекомендуемого производителем (от 30 до 50 мин).

Таким образом, по итогам клонирования цепей антител в вектор pcDNA3.4 [101], 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 13,14).

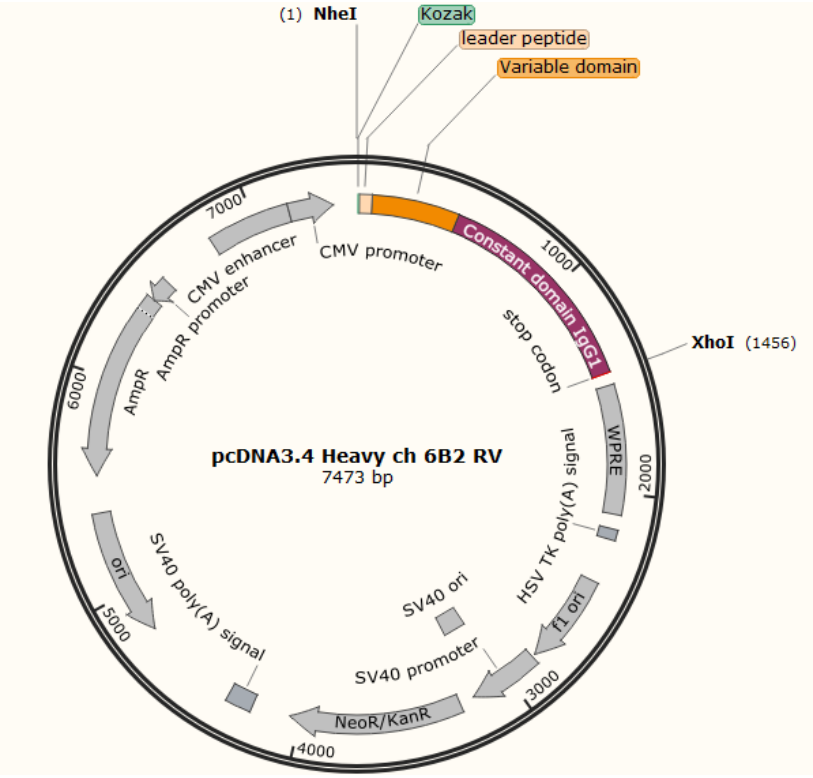

Рисунок 13. Схема экспрессионной плазмиды, кодирующей HC рекомбинантного мАТ (на примере мАТ 6B2)

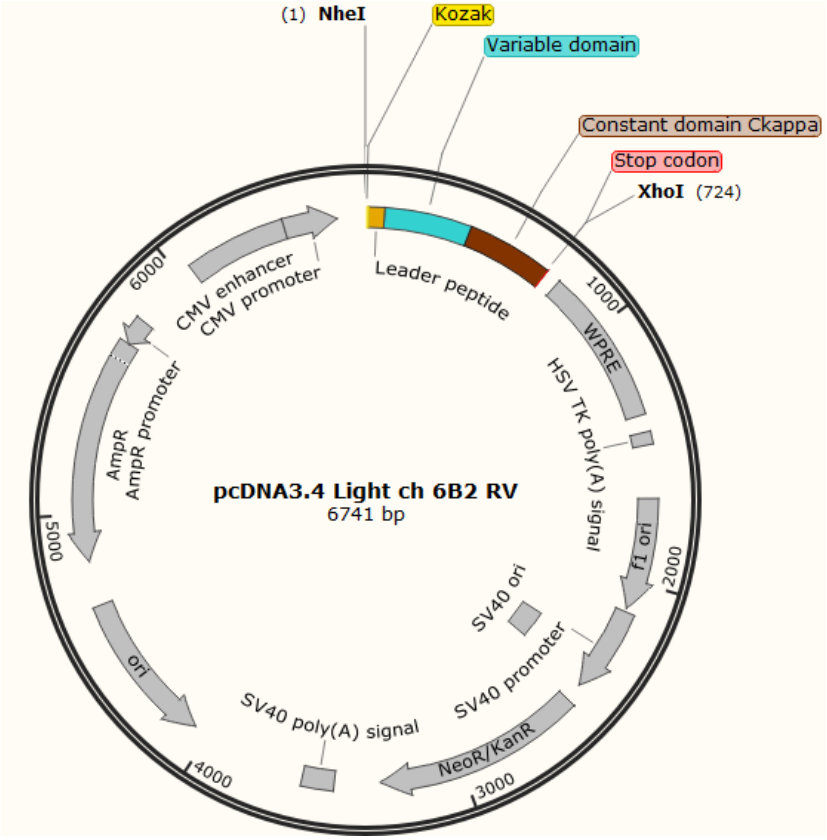

Рисунок 14. Схема экспрессионной плазмиды, кодирующей LC рекомбинантного мАТ (на примере мАТ 6B2)

Плазмиды были выделены и очищены набором для выделения плазмидной ДНК (Invitrogen, PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit). Концентрация и чистота плазмид были определены гель-электрофоретическим способом и спектрофотометрическим с помощью спектрофотометра NanoPhotometer P300 (IMPLEN, Германия). Важно, чтобы образцы выделенных плазмидных ДНК не содержали каких-либо примесей, в том числе и РНК. При необходимости плазмидные ДНК, которые предполагалось использовать для трансфекции CHO клеток, обрабатывались РНКазой, с последующим переосаждением.

БИОСИНТЕЗ И ВЫДЕЛЕНИЕ

В качестве системы экспрессии новых человеческих мАТ 6B2 и мАТ RabD4 против вируса бешенства и контрольных мАТ CR57 и мАТ CR4098 в виде полноразмерных молекул была выбрана эукариотическая экспрессионная система на основе CHO-клеток, характеризующаяся секрецией целевого белка в среду культивирования, его правильным фолдингом и гликозилированием. Данная система экспрессии позволяет получать полноразмерные антитела в функционально-активном виде в больших количествах. Благодаря вышеуказанным преимуществам клеточная линия CHO наиболее часто используемая система для лабораторного и промышленного производства рекомбинантных белков; в частности, на ее основе возможно получение полноразмерных мАТ с целью терапевтического применения.

Для последующей работы, направленной на изучение иммунохимических и вируснейтрализующих свойств целевых белков, мАТ экспрессировали транзиентно. Клетки CHO трансфицировали двумя плазмидами, сконструированными на основе вектора pcDNA3.4, несущими отдельно (LC) и (HC) цепи соответствующего мАТ. Такой подход позволяет регулировать соотношение LC и HC для оптимизации экспрессии. В случае продукции HC в отсутствие LC, первая накапливается в эндоплазматическом ретикулуме. При этом такие молекулы HC антитела имеют неправильную пространственную организацию, из-за чего подвергаются деградации в протеасомах. LC способствуют сворачиванию и секреции HC, а также замедляют деградацию белков с неправильной структурой. Избыток LC в клетках-продуцентах может минимизировать накопление HC и увеличивать скорость сборки и фолдинга молекул антитела [102]. В

данной работе это было учтено и при трансфекции клеток также 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 антитела, 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 15-17). Продуктивность используемой транзиентной системы экспрессии составила от 120 до 200 мг/л среды культивирования.

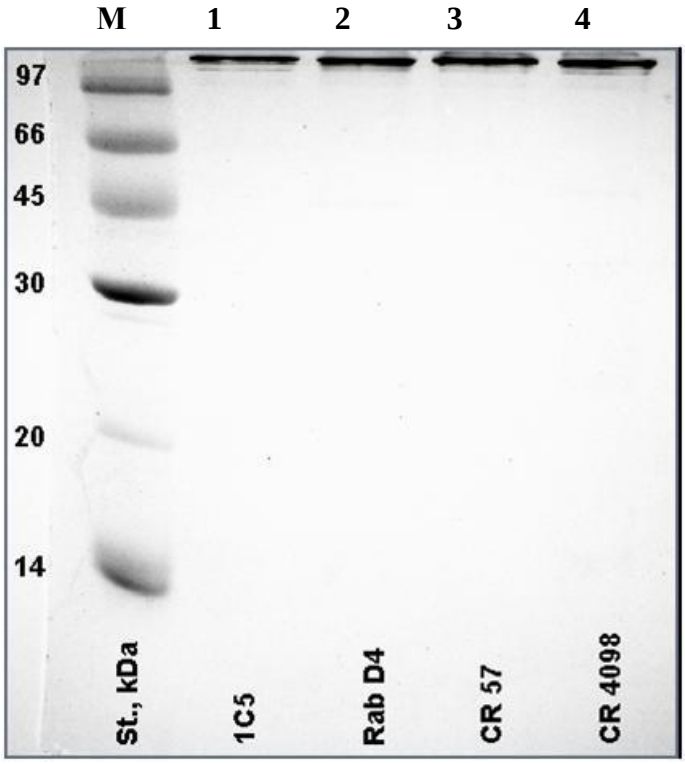

Рисунок 15. 12% SDS-ПААГ образцов в невосстанавливающих условиях (без ДТТ). М – маркеры молекулярных масс

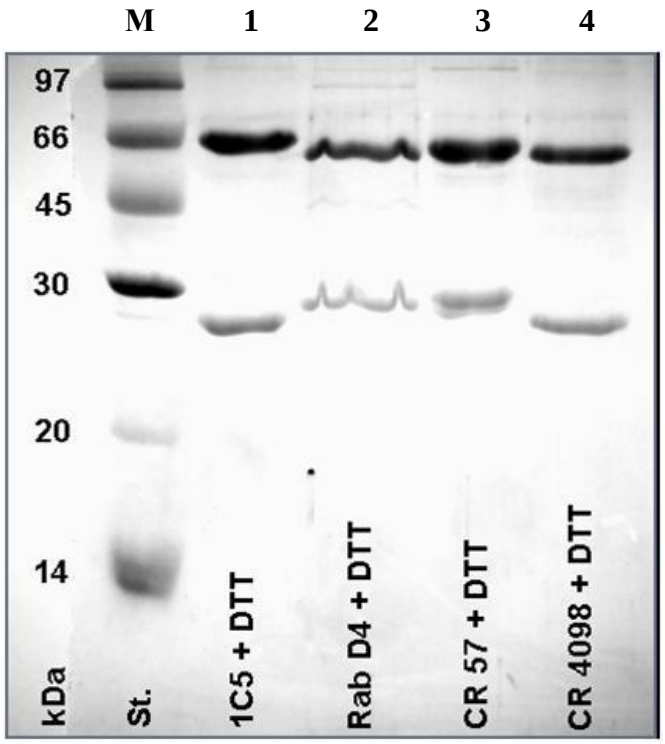

Рисунок 16. 12% SDS-ПААГ образцов в восстанавливающих условиях (с ДТТ). М – маркеры молекулярных масс

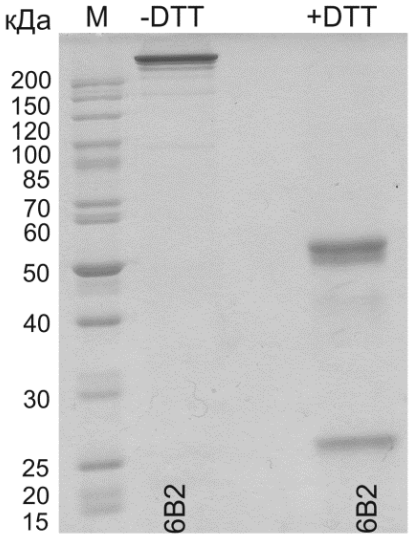

Рисунок 17. 10% SDS-ПААГ образцов в восстанавливающих условиях (с ДТТ) и в невосстанавливающих условиях (без ДТТ). М – маркеры молекулярных масс

Дополнительная очистка проводилась с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Результаты приведены на рисунках 18 и 19. Для проведения препаративной или аналитической гель-фильтрационной хроматографии использовали колонку Superdex 200-10/300-GL (GE Healthcare, США), которая позволяет эффективно разделять белки с молекулярной массой в диапазоне от 20 до 500 кДа. Для проведения

аналитической ВЭЖХ экспериментальные образцы наносили на колонку в буфере 100 мМ Трис HCl (pH 8.0) с 150 мМ NaCl. Таким образом, были детектированы и удалены мультимерные нековалентно связанные формы мАТ (результаты показаны на примере очистки мАТ CR4098 на рисунке 20). После этого полученные рекомбинантные мАТ (расчетный размер 150 кДа) диализовали против ФСБ, если требовалось концентрировали через мембрану с порогом отсечения 10 кДа и хранили в стерильном виде на +4°С.

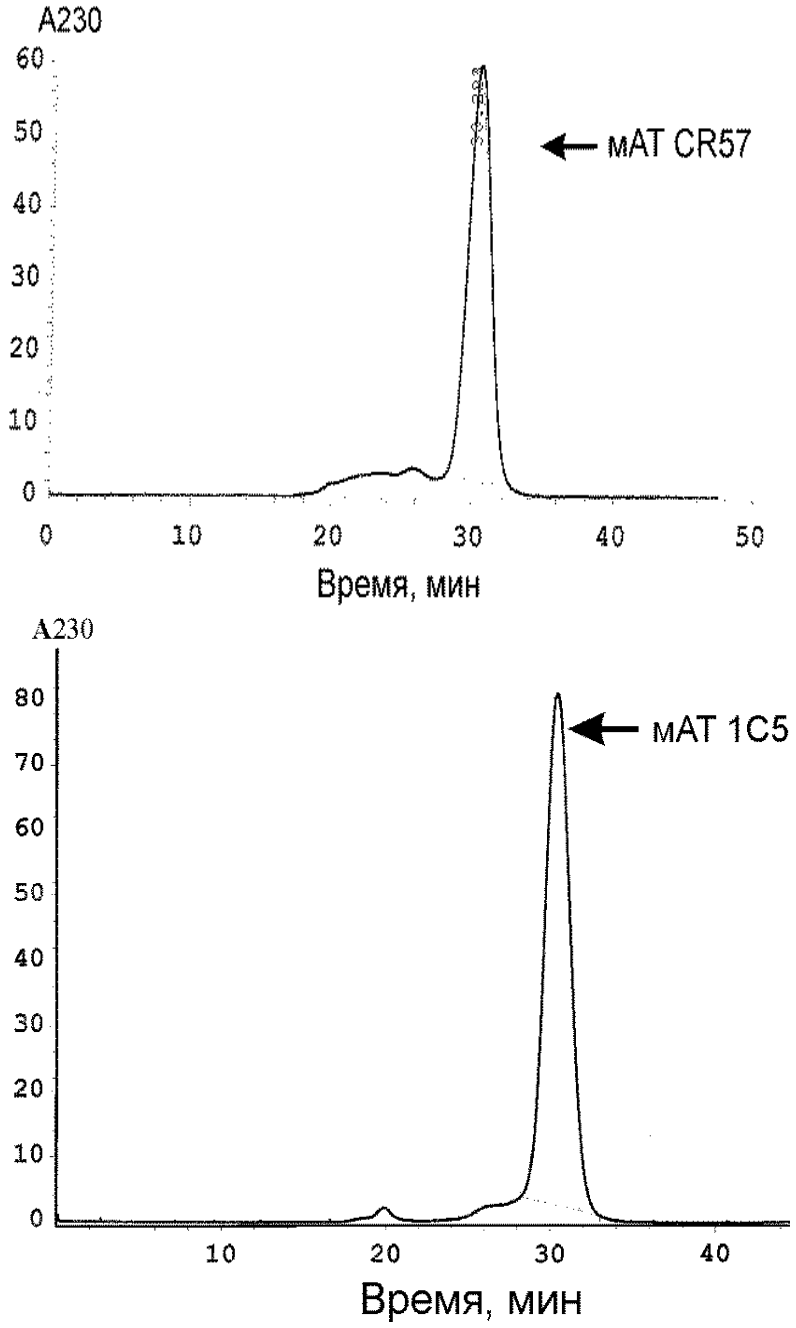

Рисунок 18. Результаты аналитической ВЭЖХ образцов мАТ CR57 и мАТ 1С5 на колонке Superdex 200- 10/300 GL

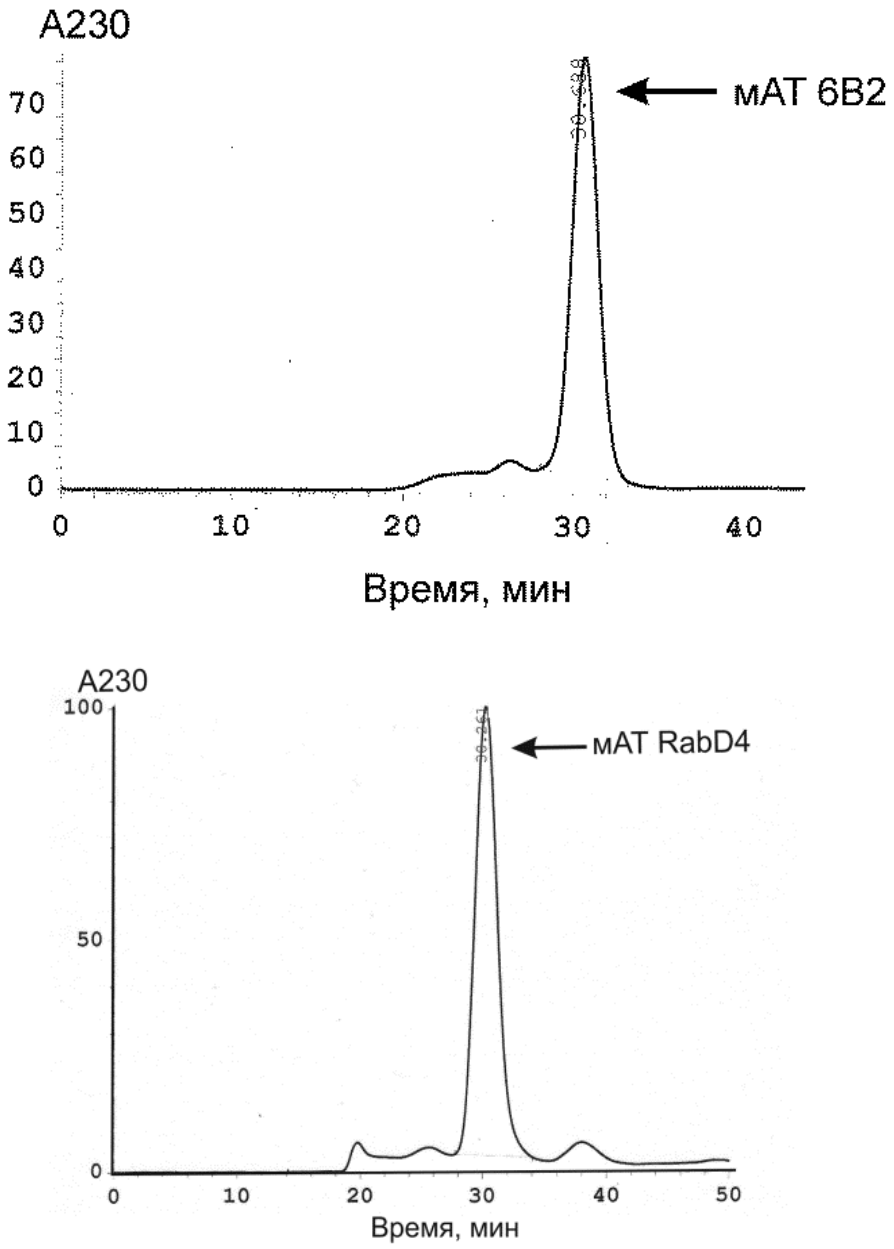

Рисунок 19. Результаты аналитической ВЭЖХ образцов мАТ 6В2 и мАТ RabD4 на колонке Superdex 200- 10/300 GL

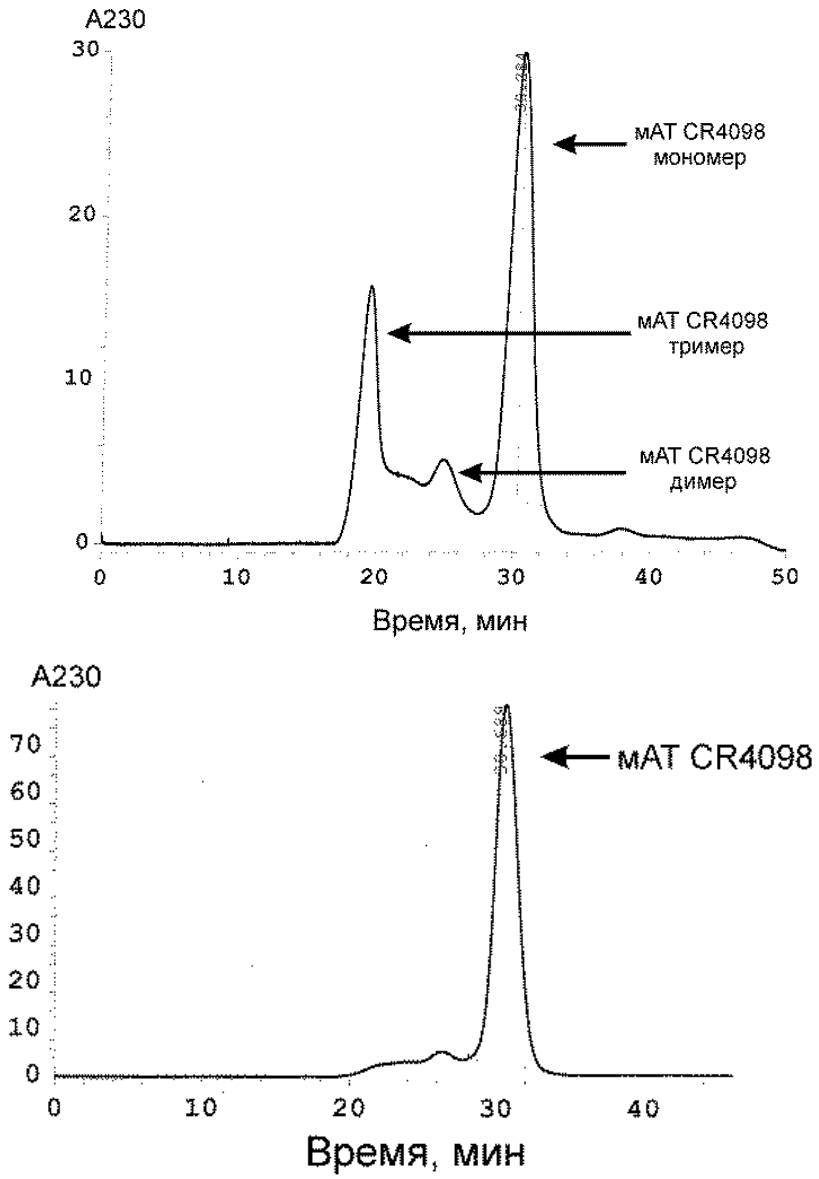

Рисунок 20. Результаты аналитической ВЭЖХ экспериментального образца мАТ CR4098 на колонке Superdex 200- 10/300 GL до и после дополнительной стадии очистки с помощью гель-фильтрационной хроматографии на колонке Superdex 200- 10/300 GL

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. Так как препарат на основе рекомбинантных мАТ против ГПВБ предназначен для экстренной постэкспозиционной профилактики

бешенства, мАТ, входящие в его состав 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 (что является необходимым для дальнейшего размножения вируса в организме человека и, следовательно, развитию инфекции), 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 [103].

Сывороточные препараты на основе антирабических иммуноглобулинов содержат поликлональные антитела, часть из которых являются вируснейтрализующими, при этом для терапевтического применения оценивают общую антирабическую активность препарата (то есть смеси антител). В случае разработки препарата на основе мАТ или коктейля мАТ, необходим скрининг кандидатных антител в отношении специфической антирабической (вируснейтрализующей) активности на ранних этапах, а также количественное определение специфической активности относительно стандарта человеческого антирабического иммуноглобулина ВОЗ, заменой которому может стать разрабатываемый препарат на основе рекомбинантных мАТ против ГПВБ.

В настоящее время флюоресцентный вируснейтрализующий тест FAVN является стандартным методом для количественного определения антирабической активности препаратов и титра антирабических антител в сыворотке вакцинированных животных и человека, рекомендованным ВОЗ и применяемым в аккредитованных референт-лабораториях по бешенству во всем мире. Данный тест представляет собой исследование нейтрализации вируса и был разработан для скрининга образцов сывороток животных как стандартный метод для оценки адекватного уровня титра антирабических антител после вакцинации. Тест проводится на живом вирусе бешенства штамма CVS-11, который является стандартным штаммом, используемым для установления вируснейтрализующей активности.

Для исследования вируснейтрализующей активности новых рекомбанантных антител: мАТ 1C5, мАТ RabD4 и мАТ 6B2, использовали тест FAVN с применением культурального штамма вируса бешенства CVS-11. Дополнительно в тестирование были

включены в качестве положительных контролей два известных мАТ к ГПВБ, CR57 и CR4098 (Crucell), с подтвержденной нейтрализующей активностью в тестах не только *in vitro*, но и *in vivo* [104]. 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).

Результаты теста FAVN показали, что мАТ 1C5 и мАТ RabD4 являются высоконейтрализующими, как и антитела сравнения CR57 и CR4098 (в таблице 8 приведены усредненные значения, полученные после 3 независимых измерений). Для мАТ 6B2 было установлено, что оно не обладает вируснейтрализующей активностью, поэтому оно было исключено из дальнейшей работы. Это согласуется с выводом Bakker et al. [105], что нейтрализующая активность не корелирует с аффинностью взаимодействия. Вероятно, мАТ 6B2 взаимодействует с сайтом, блокирование которого не снижает инфицирующую способность вируса. В среднем количество молекул IgG, необходимых для нейтрализации вириона RABV варъируется от 20 до 1000, и зависит от того, где находится эпитоп [103], [106].

Таблица 8. Результаты исследования антирабической активности образцов антител методом FAVN с использованием культурального фиксированного 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

ПРОВЕРКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ мАТ В НЕПРЯМОМ ИФА

Для проверки функциональной активности мАТ RabD4 и мАТ 1C5 был проведен непрямой ИФА с использованием нативного ГПВБ (штамм “Внуково-32”) в качестве

антигена. В эксперимент также были включены референтные мАТ CR4098 и мАТ CR57, результаты приведены на рисунке 21.

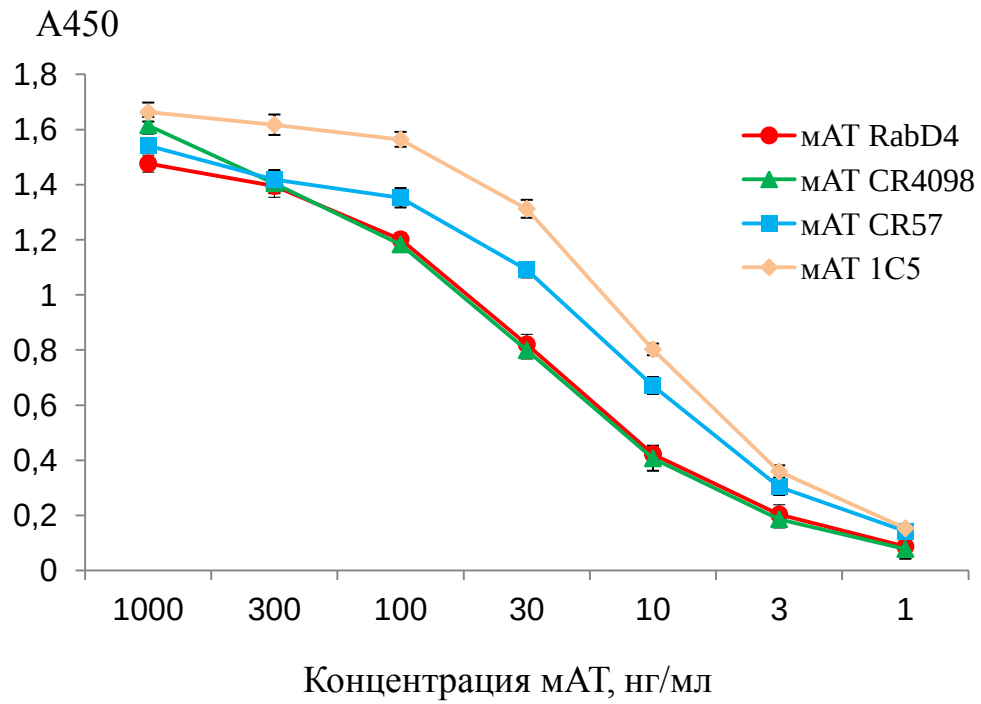

Рисунок 21. Связывание с нативным ГПВБ мАТ 1С5, мАТ CR4098, мАТ CR57 и мАТ RabD4, которое было установлено с помощью непрямого ИФА и выражено как значение оптической плотности, зарегистрированное при длине волны 450 нм. ГПВБ сорбировали на планшет в концентрации 10 мкг/мл

Из представленных данных следует, что полученные мАТ 1С5 и мАТ RabD4 обладают высоким сродством к ГПВБ. Для выявления связывания использовали пероксидазный конъюгат поликлональных антител против IgG человека – ПХ, что подтверждает также человеческую природу мАТ RabD4 и высокую долю аминокислотных остатков мАТ 1С5, соответствующих человеческим последовательностям, в результате проведения успешной 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. Кд комплекса антиген-антитело полученного полноразмерного мАТ 1С5 определяли методом конкурентного ИФА по Фриге и др. [81]. Нативный ГПВБ, выделенный из вирусных частиц штамма “Внуково-32”, сорбировали в лунки планшета в концентрации 10 мкг/мл, для каждого мАТ была полученна кривая связывания в координатах Клотца [82] (рисунки 22).

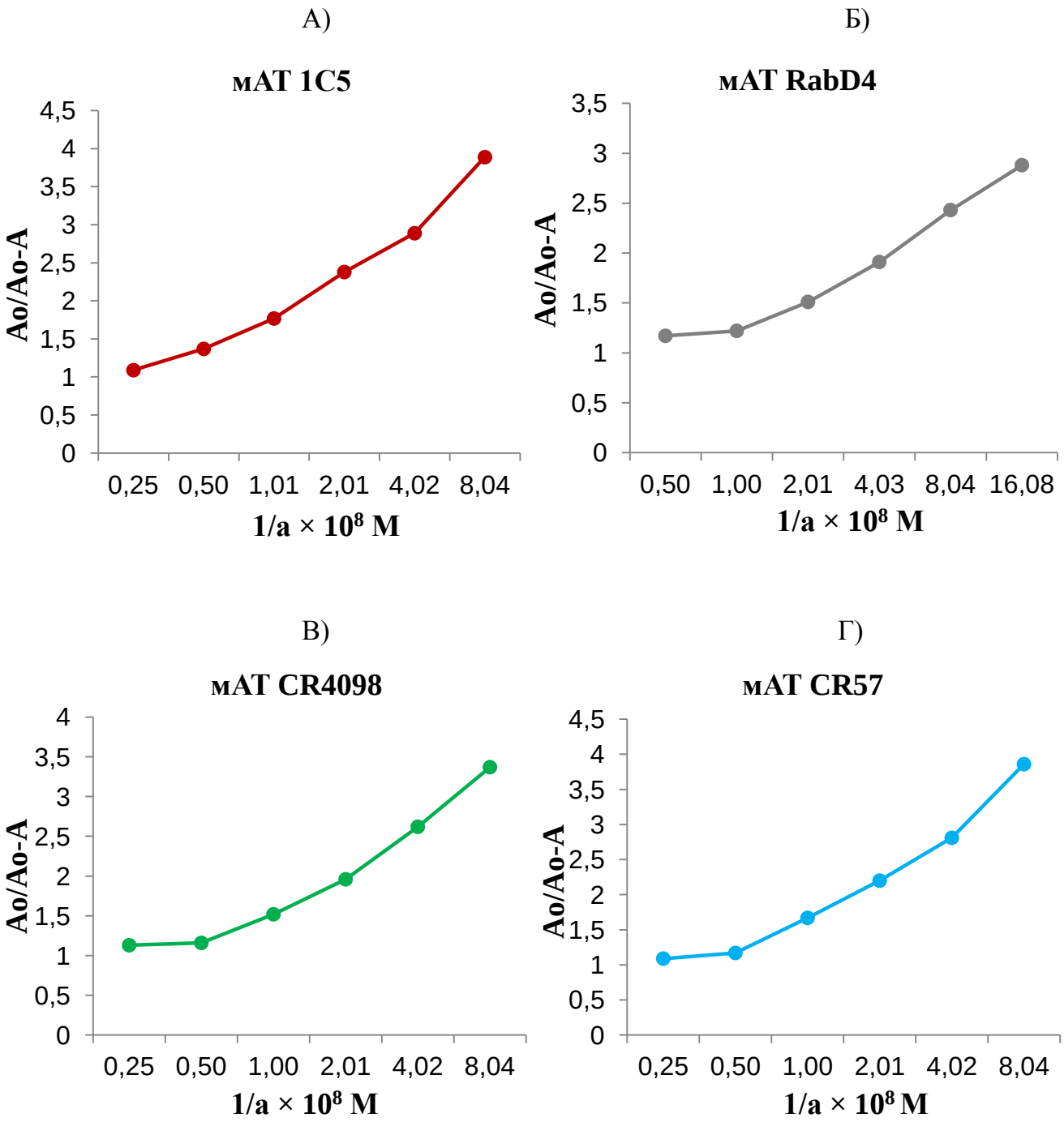

Рисунок 22. Кривые Клотца связывания ГПВБ для мАТ 1С5 (А), мАТ RabD4 (Б), мАТ CR4098 (В) и мАТ CR57 (Г), где Ao и А – оптическое поглощение (λ450) раствора

мАТ в отсутствие антигена и раствора свободных мАТ в смеси антиген – антитело, а – молярная концентрация антигена

В результате подбора диапазона концентраций антигена от 4 мкг/мл до 0,125 мкг/мл для мАТ RabD4 и от 8 мкг/мл до 0,25 мкг/мл для мАТ 1C5, мАТ CR4098 и мАТ CR57 были получены кривые Клотца, представляющие собой почти линейные кривые, что позволило использовать упрощенный способ расчета Кд.

Значения Кд комплексов мАТ + ГПВБ приведены в таблице 9, где также указаны стандартные отклонения для четырех точек титрования. Для расчетов использовали молекулярную массу нативного ГПВБ, который представлен в виде тримера, – 201 кДа [107].

Таблица 9. Значения Кд для 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 1C5	$6{,}6\times10^{-9}$	$1{,}3\times10^{-9}$
мАТ RabD4	$2{,}2\times10^{-9}$	3×10^{-10}

Как следует из представленных данных, полученные гуманизированное мАТ 1C5 и человеческое мАТ RabD4 обладают высоким сродством к ГПВБ.

Из литературных данных известно, что Кд мАТ CR57 и мАТ CR4098 составляет $2{,}4\times10^{-9}$ М и $4{,}5\times10^{-9}$ М, соответственно [104], что подтверждает точность измерения.

ВЫДЕЛЕНИЕ ГПВБ С ПОМОЩЬЮ МЕТАЛЛ-АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Дополнительной задачей стало получение рекомбинантного ГПВБ, представленного экстрацеллюлярным доменом (а.о. 20-459, который использовался при исследовании иммунохимических свойств мАТ. Был выбран штамм CVS-11, являющийся стандартным объектом при исследовании активности препаратов против вируса бешенства.

Для решения данной задачи необходимо получить препарат максимально идентичный нативному гликопротеину. В связи с этим при разработке экспрессионной системы важно добиться получения белка, обладающего правильной конформацией и надлежащим профилем гликозилирования. Система экспрессии на основе клеток млекопитающих CHO, благодаря техническим преимуществам перед дрожжевой, растительной или бактериальной системами, способна обеспечить необходимым количеством целевого белка с необходимыми свойствами.

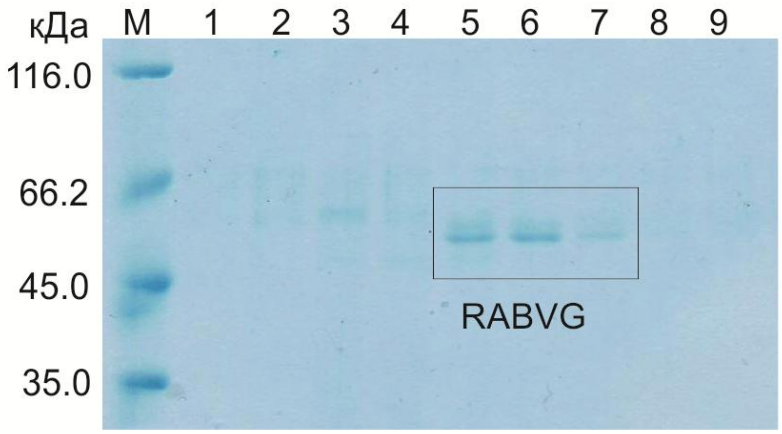

Рисунок 23. Электрофореграмма (12% SDS-ПААГ) элюированных фракций после металл-аффинной хроматографии с использованием Ni^{2+}ИДА-сефарозе, нанесенных в присутствии β-меркаптоэтанола. М – маркеры молекулярной массы, 5-7 – фракции, содержащие ГПВБ

Таким образом, рекомбинантный ГПВБ был наработан в CHO-клетках путем транзиентной экспрессии с использованием экспрессионной плазмиды на основе вектора pcDNA3.4 (рисунок 23).

Для надлежащей экспрессии в эукариотической системе на 5’-конец ДНК фрагмента ГПВБ была добавлена последовательность Козак, лидерный пептид был оставлен природный вирусный, а на 3’-конец – последовательность, кодирующая полигистидиновый таг (12His) для очистки белка с помощью металл-аффинной хроматографии.

Для очистки рекомбинантного ГПВБ использовали металл-аффинную хроматографию на Ni^{2+}ИДА-сефарозе (GE Healthcare, США) с последующей элюцией имидизолом 300 мМ. Дополнительная очистка не потребовалась, т. к. белок был выделен в чистом виде, что подтверждают результаты электрофоретического разделения и окраски в SDS-ПААГ рекомбинантного ГПВБ после выделения. Полоса,

проявившаяся в результате окраски SDS-ПААГ Кумаси R-250, соответствует расчетному размеру целевого белка (его мономерной форме) – 53 кДа.

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

Известно, что растворимая форма гликопротеина G, лишенная его нативных цитоплазматического и трансмембранного доменов, также является антигенной и иммуногенной [108]. Поэтому для упрощения процесса экспрессии и очистки решено было получить экстрацеллюлярный домен ГПВБ.

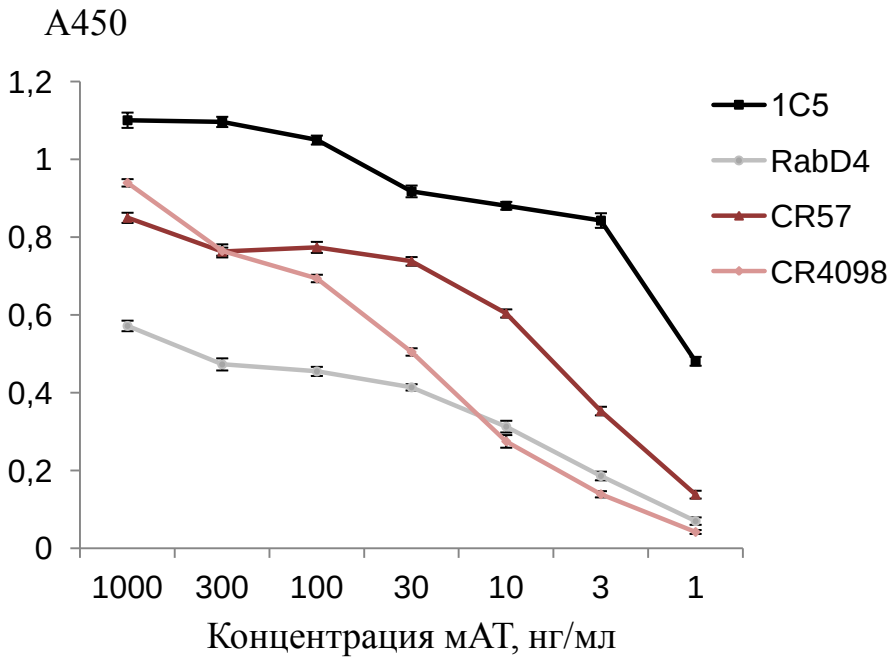

Рисунок 24. Связывание с рекомбинантным ГПВБ мАТ 1C5, мАТ CR4098, мАТ CR57 и мАТ RabD4, установленное с помощью непрямого ИФА и выражено как значение оптической плотности, зарегистрированное при длине волны 450 нм. ГПВБ сорбировали на планшет в концентрации 1 мкг/мл

Функциональная активность рекомбинантного ГПВБ, а также способность мАТ узнавать ГПВБ в такой форме были изучены в непрямом ИФА. Результаты приведены на рисунке 24.

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 концентрационозависимая олигомеризация. Таким образом, вспоминая что нативный ГПВБ, представляет собой тримерную стабильную молекулу, становится понятно почему характер взаимодействия мАТ с рекомбинантным ГПВБ несколько изменился. Скорей всего это связано со структурными особенностями отдельных АС, которые могут иметь несколько отличающуюся конформацию в случае мономерной или тримерной формы ГПВБ [109]

ИММУНОБЛОТТИНГ мАТ

Специфичность взаимодействия мАТ 1С5 и мАТ 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, мАТ RabD4 или контрольным мАТ CR4098. Результаты иммуноблоттинга демонстрируют, что оба антитела связываются с одной и той же белковой полосой, мигрирующей в ПААГ на уровне 66 кДа, что соответствует мономерной форме нативного ГПВБ (рисунок 25).

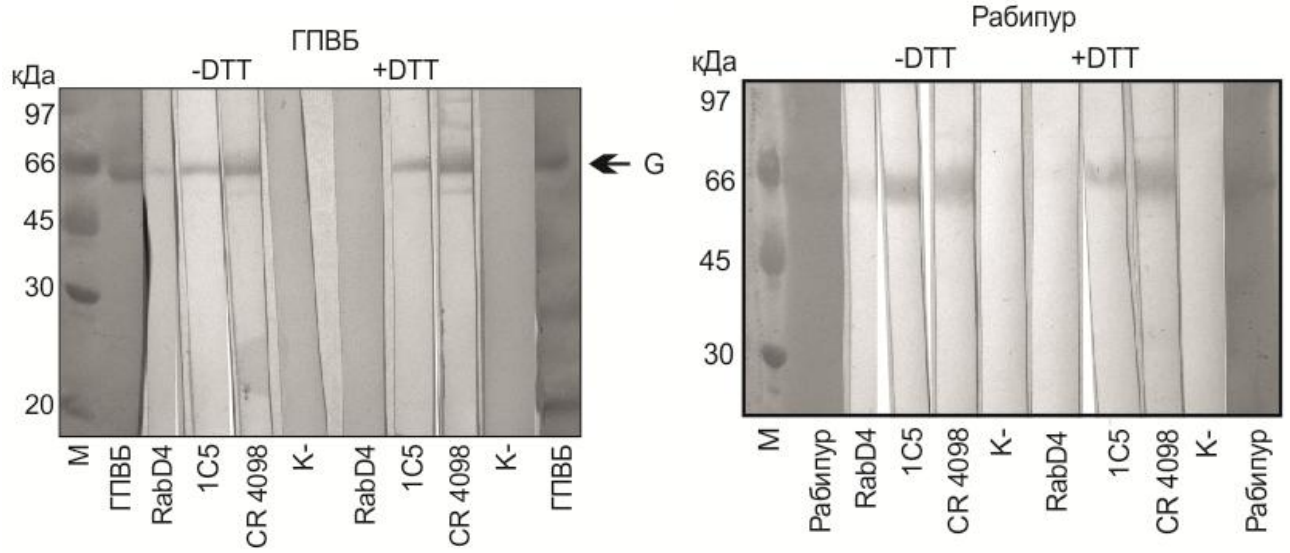

Рисунок 25. Вестерн-блот-анализ связывания мАТ 1С5, мАТ RabD4 и мАТ CR4098 с высокоочищенным нативным ГПВБ и с вакциной Рабипур (штамм Flury-LEP). Образцы были нанесены в невосстанавливающих условиях (–DTT) без кипячения пробы

и в восстанавливающих условиях (+DTT) с кипячением пробы. М– маркеры молекулярных масс, К- – отрицательный контроль

Из результатов анализа видно, что все мАТ, включенные в эксперимент, узнают белок, соответствующий размеру ГПВБ. При этом на взаимодействие мАТ 1C5 и мАТ 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 Рабипур 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

Значение вируснейтрализующей активности исследуемого мАТ RabD4, определенное в интрацеребральном тесте, должно быть выражено в международных единицах активности на мг белка. Для этого в эксперимент был включен международный стандарт с известной активностью (Стандарт European Pharmacopoeia Reference Standard Human rabies immunoglobulin BPR, Strasburg.Batch: 1.1, Id: 004X14, 91ME/ml). В сравнении с этим стандартом была рассчитана эффективность тестируемого мАТ RabD4 и представлена в виде МЕ/мг.

В работе исследована терапевтическая 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 дней, поэтому учитывались животные павшие только после этого срока.

Исследовательские испытания эффективности проводились на мышах линии Balb/c. Могут также быть использованы другие животные, например сирийский хомяк, но мыши на ранних сроках развития более чувствительны к данному штамму вируса бешенства, что способствует получению более показательной модели применения мАТ.

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 методике. Специфическая активность, рассчитанная в сравнении с международным стандартом составила 144 МЕ/мг для мАТ RabD4 (таблица 10) и 418 МЕ/мг для мАТ 1C5 (таблица 11).

Таблица 10. 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 11. 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					

Как показано в таблице 10, 11 выживаемость мышей снижалась в связи с разведением 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.

Интрацеребральный тест является высокочувствительным методом, однако он трудоемок и сложен в исполнении. В последнее время все чаще используют флуоресцентные нейтрализующие тесты, такие как FAVN и RFFIT [110], в связи с необходимостью проведения исследования и получения результатов в короткие сроки. Однако, *in vivo* тест на мышах представляет собой более сложную, надежную модель, с показательными результатами касаемо биологических свойств испытуемых препаратов.

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

Чтобы определить, с каким АС взаимодействуют мАТ 1С5 и мАТ RabD4, был проведен ряд экспериментов с использованием метода ИФА по изучению конкуренции при связывании с ГПВБ экспериментальных образцов и двух референтных антител CR57 и CR4098. Ранее в работе [104] 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 мАТ 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. Результаты представлены на рисунках 26-28.

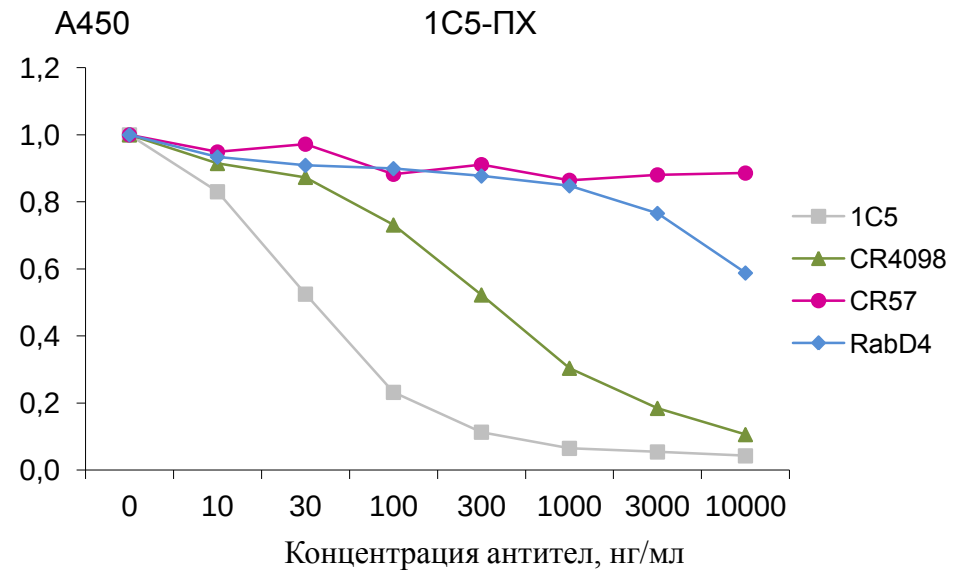

Рисунок 26. Конкурентный ИФА мАТ 1С5, мАТ RabD4 мАТ CR57, мАТ CR4098 с конъюгатом пероксидазы хрена мАТ 1С5–ПХ. По оси ординат отложены значения оптической плотности B/Bo, где B и Bo – оптическое поглощение (λ 450 нм) в присутствии конкурирующего антитела и без добавления конкурирующего антитела

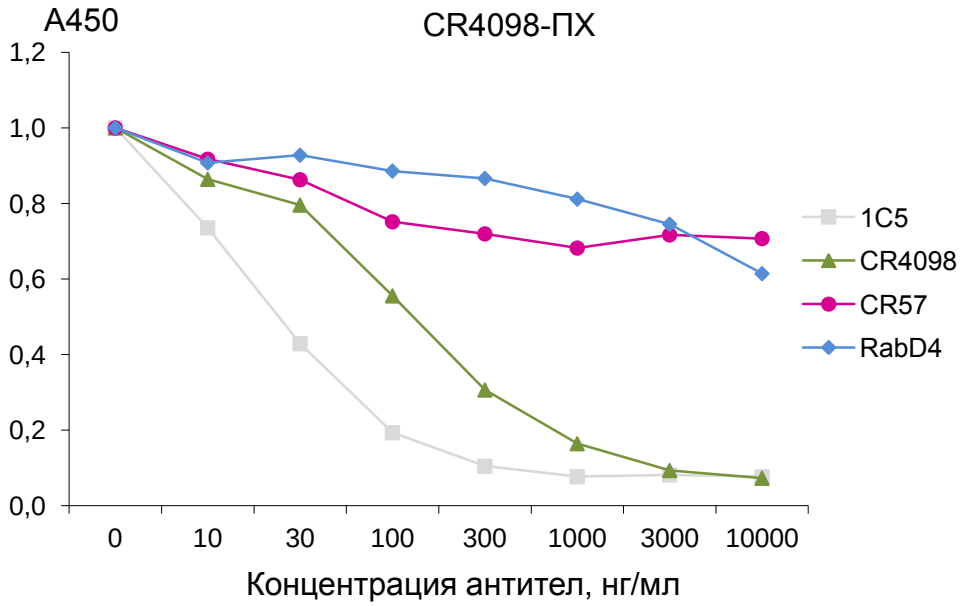

Рисунок 27. Конкурентный ИФА мАТ 1С5, мАТ RabD4 мАТ CR57, мАТ CR4098 с конъюгатом пероксидазы хрена мАТ CR4098–ПХ. По оси ординат отложены значения оптической плотности B/Bo, где B и Bo – оптическое поглощение (λ 450 нм) в присутствии конкурирующего антитела и без добавления конкурирующего антитела

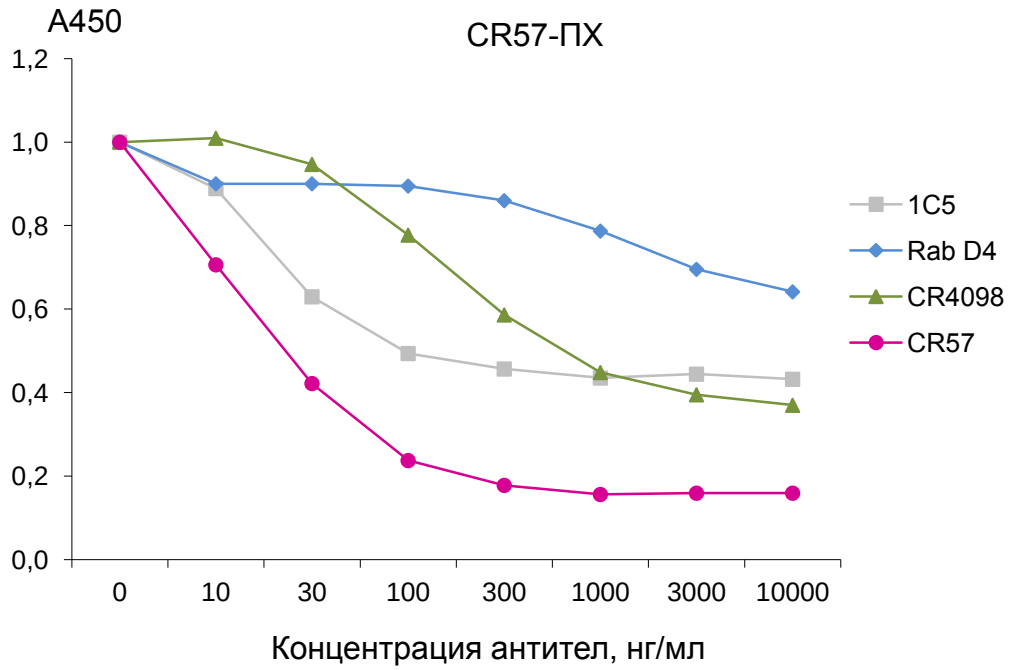

Рисунок 28. Конкурентный ИФА мАТ 1С5, мАТ RabD4 мАТ CR57, мАТ CR4098 с конъюгатом пероксидазы хрена мАТ CR57–ПХ. По оси ординат отложены значения оптической плотности B/Bo, где B и Bo – оптическое поглощение (λ 450 нм) в присутствии конкурирующего антитела и без добавления конкурирующего антитела

Результаты конкурентного ИФА (рисунки 26-28) 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, мАТ CR4098 и мАТ 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 29). АС III является консервативным и считается второй по значимости антигенной детерминантой вируса бешенства, с которой взаимодействуют нейтрализующие антитела [28], [60]. Данный АС включает аминокислотные остатки 330–338, наиболее вариабельными из которых являются 332, 333, 336, 338 [62].

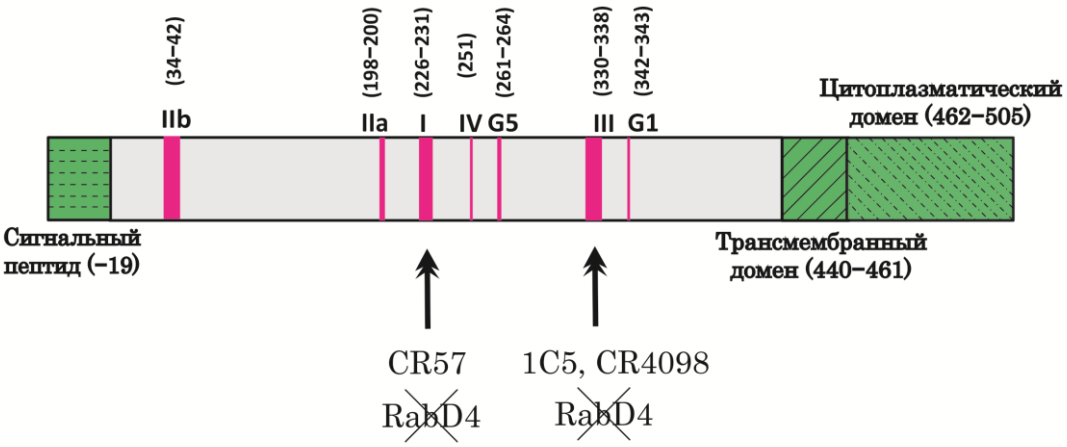

Рисунок 29. Специфичность мАТ по отношению к ГПВБ

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 20), и следовательно, может быть использовано в комбинации с мАТ 1С5.

Данный факт очень важен для постэкспозиционной профилактики бешенства, 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 характристикой 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 большое разнообразие штаммов вируса по всему миру, отличающихся между собой точечными мутациями, локализованными, в т.ч. в антигенных сайтах приводит к высокой степени вариации эпитопов. Таким образом, применение мАТ для ПЭП должно основываться на комбинировании как минимум двух антител различной специфичности, что позволит нейтрализовать большинство или все известные штаммы.

В ходе выполнения работы было осуществлено конструирование полноразмерного мАТ 1C5 (IgG1/κ). Была оптимизирована методика получения человеческих мАТ против ГПВБ. Было проведено выделение из периферической крови иммунизированного донора человеческих клеточных популяций: моноциты, CD4+ Т-лимфоциты и В-лимфоциты. Были получены зрелые дендритные клетки, презентирующие ГПВБ. Была проведена *in vitro* стимуляция В-лимфоцитов посредством инкубации данных клеток в присутствии ГПВБ, CD4+ Т-лимфоцитов, зрелых дендритных клеток и цитокинов. Были получены гетерогибридомы В-лимфоцитов, продуцирующие человеческие мАТ против ГПВБ. Было так же 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 6B2 и RabD4 для выделения генетического материала. Из соответствующих гетерогибридом была выделена РНК, при этом для выделения генетического материала из малого количества клеток предварительно было исследовано влияние соосадителя, гликогена, в результате чего процесс был оптимизирован.

Оптимизированна 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 цепей мАТ – необходим двухкратный избыток плазмиды, кодирующей LC, по отношению к плазмиде, кодирующей HC, что способствует высокому выходу иммуноглобулиновых молекул правильной структуры и мономерной формы. При этом использование клеточной линии CHO позволяет легко масштабировать процесс культивирования, а также дает возможность получения стабильного продуцента.

Продемонстрирована высокая технологичность мАТ RabD4 и мАТ 1C5. 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 мАТ 1C5 в результате проведения общепризнанного 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 1C5 и мАТ RabD4, значение Кд антиген-антитело составило не более 10 нМ. Была исследована антигенная специфичность мАТ 1C5 и мАТ RabD4, в результате чего было установлено, что мАТ 1C5 направлено к одному из консервативных эпитопов (АС III), а мАТ RabD4 имеет индивидуальный эпитоп и не конкурирует за связывание с мАТ 1C5.

Протективная активность мАТ 1С5 и мАТ RabD4 была исследована на мышах в тестах *in vivo*. Результаты интрацеребрального теста подтвердили способность вышеуказанных мАТ оказывать вирснейтрализующее 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 постэкспозиционной профилактики 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, который и может быть создан на основе антирабических нейтрализующих рекомбинантных мАТ, полученных в данной работе.

ВЫВОДЫ

1. Проведено конструирование рекомбинантного полноразмерного 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 снизить 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 постэкспозиционной профилактики 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fisher C. R., Streicker D. G., Schnell M. J. The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers // Nat Rev Microbiol. – 2018. – Т. 16, № 4. – С. 241-255.

2. Banyard A. C., Horton D. L., Freuling C., Muller T., Fooks A. R. Control and prevention of canine rabies: the need for building laboratory-based surveillance capacity // Antiviral Res. – 2013. – Т. 98, № 3. – С. 357-64.

3. Suwansrinon K., Jaijareonsup W., Wilde H., Benjavongkulchai M., Sriaroon C., Sitprija V. Sex- and age-related differences in rabies immunoglobulin hypersensitivity // Trans R Soc Trop Med Hyg. – 2007. – Т. 101, № 2. – С. 206-8.

4. Tepsumethanon S., Tepsumethanon V., Tantawichien T., Suwansrinon K., Wilde H. Problems in human rabies post-exposure prophylaxis management // Travel Med Infect Dis. – 2007. – Т. 5, № 3. – С. 189-93.

5. Suwansrinon K., Jaijaroensup W., Daviratanasilpa S., Sriaroon C., Wilde H., Sitprija V. Adverse reactions to human rabies immune globulin manufactured by the Thai Red Cross Society // Vaccine. – 2005. – Т. 23, № 11. – С. 1324-5.

6. Черкасский Б.Л. Х. О. С., Мовсесянц А.А. Эпидемиологический надзор за бешенством в Российской Федерации // Вакцинация. Новости вакцинопрофилактики. – 2005. – Т. 1, № 37.

7. Dietzschold B., Tollis M., Lafon M., Wunner W. H., Koprowski H. Mechanisms of rabies virus neutralization by glycoprotein-specific monoclonal antibodies // Virology. – 1987. – Т. 161, № 1. – С. 29-36.

8. Sloan S. E., Hanlon C., Weldon W., Niezgoda M., Blanton J., Self J., Rowley K. J., Mandell R. B., Babcock G. J., Thomas W. D., Jr., Rupprecht C. E., Ambrosino D. M. Identification and characterization of a human monoclonal antibody that potently neutralizes a broad panel of rabies virus isolates // Vaccine. – 2007. – Т. 25, № 15. – С. 2800-10.

9. Dietzschold B., Gore M., Casali P., Ueki Y., Rupprecht C. E., Notkins A. L., Koprowski H. Biological characterization of human monoclonal antibodies to rabies virus // J Virol. – 1990. – Т. 64, № 6. – С. 3087-90.

10. Kramer R. A., Marissen W. E., Goudsmit J., Visser T. J., Clijsters-Van der Horst M., Bakker A. Q., de Jong M., Jongeneelen M., Thijsse S., Backus H. H., Rice A. B., Weldon W. C., Rupprecht C. E., Dietzschold B., Bakker A. B., de Kruif J. The human antibody repertoire

specific for rabies virus glycoprotein as selected from immune libraries // Eur J Immunol. – 2005. – T. 35, № 7. – C. 2131-45.

11. Chao T. Y., Ren S., Shen E., Moore S., Zhang S. F., Chen L., Rupprecht C. E., Tsao E. SYN023, a novel humanized monoclonal antibody cocktail, for post-exposure prophylaxis of rabies // PLoS Negl Trop Dis. – 2017. – T. 11, № 12. – C. e0006133.

12. Ecker D. M., Jones S. D., Levine H. L. The therapeutic monoclonal antibody market // MAbs. – 2015. – T. 7, № 1. – C. 9-14.

13. Baltimore D. Expression of animal virus genomes // Bacteriol Rev. – 1971. – T. 35, № 3. – C. 235-41.

14. Johnson N., Vos A., Freuling C., Tordo N., Fooks A. R., Muller T. Human rabies due to lyssavirus infection of bat origin // Vet Microbiol. – 2010. – T. 142, № 3-4. – C. 151-9.

15. Rhabdoviridae, in Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. / Dietzgen R. G., Calisher, C.H., Kurath, G., Kuzmin, I.V., Rodriguez, L.L., Stone, D.M., Tesh, R.B., Tordo, N., Walker, P.J., Wetzel, T., and Whitfield, A.E. – Oxford: Elsevier, 2011.

16. Badrane H., Bahloul C., Perrin P., Tordo N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity // J Virol. – 2001. – T. 75, № 7. – C. 3268-76.

17. Marston D. A., Horton D. L., Ngeleja C., Hampson K., McElhinney L. M., Banyard A. C., Haydon D., Cleaveland S., Rupprecht C. E., Bigambo M., Fooks A. R., Lembo T. Ikoma lyssavirus, highly divergent novel lyssavirus in an African civet // Emerg Infect Dis. – 2012. – T. 18, № 4. – C. 664-7.

18. Hooper P. T., Lunt, R.A., Gould, A.R., Samaratunga, H., Hyatt, A.D., Gleeson, L.J., Rodwell, B.J., Rupprecht, C.E., Smith, J.S., Murray, P.K. A new lyssavirus-the first endemic rabies-related virus recognized in Australia. // Bull Inst Pasteur. – 1997. – T. 95. – C. 209-218.

19. Kuzmin I. V., Hughes G. J., Botvinkin A. D., Orciari L. A., Rupprecht C. E. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition // Virus Res. – 2005. – T. 111, № 1. – C. 28-43.

20. Lafon M. Rabies virus receptors // J Neurovirol. – 2005. – T. 11, № 1. – C. 82-7.

21. Wunner W. H., Reagan K. J., Koprowski H. Characterization of saturable binding sites for rabies virus // J Virol. – 1984. – T. 50, № 3. – C. 691-7.

22. Cox J. H., Dietzschold B., Schneider L. G. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization // Infect Immun. – 1977. – Т. 16, № 3. – С. 754-9.

23. Celis E., Ou D., Dietzschold B., Koprowski H. Recognition of rabies and rabies-related viruses by T cells derived from human vaccine recipients // J Virol. – 1988. – Т. 62, № 9. – С. 3128-34.

24. Shakin-Eshleman S. H., Remaley A. T., Eshleman J. R., Wunner W. H., Spitalnik S. L. N-linked glycosylation of rabies virus glycoprotein. Individual sequons differ in their glycosylation efficiencies and influence on cell surface expression // J Biol Chem. – 1992. – Т. 267, № 15. – С. 10690-8.

25. Gaudin Y., Tuffereau C., Benmansour A., Flamand A. Fatty acylation of rabies virus proteins // Virology. – 1991. – Т. 184, № 1. – С. 441-4.

26. Marissen W. E., Kramer R. A., Rice A., Weldon W. C., Niezgoda M., Faber M., Slootstra J. W., Meloen R. H., Clijsters-van der Horst M., Visser T. J., Jongeneelen M., Thijsse S., Throsby M., de Kruif J., Rupprecht C. E., Dietzschold B., Goudsmit J., Bakker A. B. Novel rabies virus-neutralizing epitope recognized by human monoclonal antibody: fine mapping and escape mutant analysis // J Virol. – 2005. – Т. 79, № 8. – С. 4672-8.

27. Prehaud C., Coulon P., LaFay F., Thiers C., Flamand A. Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence // J Virol. – 1988. – Т. 62, № 1. – С. 1-7.

28. Benmansour A., Leblois H., Coulon P., Tuffereau C., Gaudin Y., Flamand A., Lafay F. Antigenicity of rabies virus glycoprotein // J Virol. – 1991. – Т. 65, № 8. – С. 4198-203.

29. Broughan J. H., Wunner W. H. Characterization of protein involvement in rabies virus binding to BHK-21 cells // Arch Virol. – 1995. – Т. 140, № 1. – С. 75-93.

30. Chen J. F., Mandel E. M., Thomson J. M., Wu Q., Callis T. E., Hammond S. M., Conlon F. L., Wang D. Z. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation // Nat Genet. – 2006. – Т. 38, № 2. – С. 228-33.

31. Ugolini G. Rabies virus as a transneuronal tracer of neuronal connections // Adv Virus Res. – 2011. – Т. 79. – С. 165-202.

32. Ugolini G. Use of rabies virus as a transneuronal tracer of neuronal connections: implications for the understanding of rabies pathogenesis // Dev Biol (Basel). – 2008. – Т. 131. – С. 493-506.

33. Lewis P., Fu Y., Lentz T. L. Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve-muscle cocultures // Muscle Nerve. – 2000. – T. 23, № 5. – C. 720-30.

34. Lentz T. L., Hawrot E., Wilson P. T. Synthetic peptides corresponding to sequences of snake venom neurotoxins and rabies virus glycoprotein bind to the nicotinic acetylcholine receptor // Proteins. – 1987. – T. 2, № 4. – C. 298-307.

35. Langevin C., Jaaro H., Bressanelli S., Fainzilber M., Tuffereau C. Rabies virus glycoprotein (RVG) is a trimeric ligand for the N-terminal cysteine-rich domain of the mammalian p75 neurotrophin receptor // J Biol Chem. – 2002. – T. 277, № 40. – C. 37655-62.

36. Superti F., Hauttecoeur B., Morelec M. J., Goldoni P., Bizzini B., Tsiang H. Involvement of gangliosides in rabies virus infection // J Gen Virol. – 1986. – T. 67 (Pt 1). – C. 47-56.

37. Hornung V., Ellegast J., Kim S., Brzozka K., Jung A., Kato H., Poeck H., Akira S., Conzelmann K. K., Schlee M., Endres S., Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I // Science. – 2006. – T. 314, № 5801. – C. 994-7.

38. Rieder M., Conzelmann K. K. Interferon in rabies virus infection // Adv Virus Res. – 2011. – T. 79. – C. 91-114.

39. Lahaye X., Vidy A., Pomier C., Obiang L., Harper F., Gaudin Y., Blondel D. Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication // J Virol. – 2009. – T. 83, № 16. – C. 7948-58.

40. Menager P., Roux P., Megret F., Bourgeois J. P., Le Sourd A. M., Danckaert A., Lafage M., Prehaud C., Lafon M. Toll-like receptor 3 (TLR3) plays a major role in the formation of rabies virus Negri Bodies // PLoS Pathog. – 2009. – T. 5, № 2. – C. e1000315.

41. Vidy A., El Bougrini J., Chelbi-Alix M. K., Blondel D. The nucleocytoplasmic rabies virus P protein counteracts interferon signaling by inhibiting both nuclear accumulation and DNA binding of STAT1 // J Virol. – 2007. – T. 81, № 8. – C. 4255-63.

42. Lafon M. Immune evasion, a critical strategy for rabies virus // Dev Biol (Basel). – 2008. – T. 131. – C. 413-9.

43. Warrell M. J. Current rabies vaccines and prophylaxis schedules: preventing rabies before and after exposure // Travel Med Infect Dis. – 2012. – T. 10, № 1. – C. 1-15.

44. Recombinant Rabies Virus Vaccines, in Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention. / Faber M.: Elsevier Inc., 2014.

45. Yusibov V., Modelska A., Steplewski K., Agadjanyan M., Weiner D., Hooper D. C., Koprowski H. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1 // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1997. – Т. 94, № 11. – С. 5784-8.

46. Montgomery D. L., Prather K. J. Design of plasmid DNA constructs for vaccines // Methods Mol Med. – 2006. – Т. 127. – С. 11-22.

47. Красочко П. А., Ковалев, Н.А., Бучукури, Д.В., Усеня, М.М., Лысенко, А.П., Тяпша Ю.И. Методические рекомендации по изучению культуральных, антигенных, генетических свойств штаммов вируса бешенства / Ястребов А. С., Медведев А.П. – Минск: РУП "Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского", 2016. – С. 26.

48. Both L., Banyard A. C., van Dolleweerd C., Horton D. L., Ma J. K., Fooks A. R. Passive immunity in the prevention of rabies // Lancet Infect Dis. – 2012. – Т. 12, № 5. – С. 397-407.

49. Fernandes A., Kaundinya J. O., Daftary G., Saxena L., Banerjee S., Pattnaik P. Chromatographic purification of equine immunoglobulin G F(ab)2 from plasma // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. – 2008. – Т. 876, № 1. – С. 109-15.

50. Meslin F. X., Fishbein D. B., Matter H. C. Rationale and prospects for rabies elimination in developing countries // Curr Top Microbiol Immunol. – 1994. – Т. 187. – С. 1-26.

51. McKay N., Wallis L. Rabies: a review of UK management // Emerg Med J. – 2005. – Т. 22, № 5. – С. 316-21.

52. World Health O. WHO Expert Consultation on Rabies. Second report // World Health Organ Tech Rep Ser. – 2013. № 982. – С. 1-139, back cover.

53. Goudsmit J., Marissen W. E., Weldon W. C., Niezgoda M., Hanlon C. A., Rice A. B., Kruif J., Dietzschold B., Bakker A. B., Rupprecht C. E. Comparison of an anti-rabies human monoclonal antibody combination with human polyclonal anti-rabies immune globulin // J Infect Dis. – 2006. – Т. 193, № 6. – С. 796-801.

54. Faber M., Pulmanausahakul R., Hodawadekar S. S., Spitsin S., McGettigan J. P., Schnell M. J., Dietzschold B. Overexpression of the rabies virus, glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response // Journal of Virology. – 2002. – Т. 76, № 7. – С. 3374-3381.

55. Both L., van Dolleweerd C., Wright E., Banyard A. C., Bulmer-Thomas B., Selden D., Altmann F., Fooks A. R., Ma J. K. Production, characterization, and antigen specificity of recombinant 62-71-3, a candidate monoclonal antibody for rabies prophylaxis in humans // FASEB J. – 2013. – Т. 27, № 5. – С. 2055-65.

56. De Benedictis P., Minola A., Rota Nodari E., Aiello R., Zecchin B., Salomoni A., Foglierini M., Agatic G., Vanzetta F., Lavenir R., Lepelletier A., Bentley E., Weiss R., Cattoli G., Capua I., Sallusto F., Wright E., Lanzavecchia A., Bourhy H., Corti D. Development of broad-spectrum human monoclonal antibodies for rabies post-exposure prophylaxis // EMBO Mol Med. – 2016. – Т. 8, № 4. – С. 407-21.

57. Tsekoa T. L., Lotter-Stark T., Buthelezi S., Chakauya E., Stoychev S. H., Sabeta C., Shumba W., Phahladira B., Hume S., Morton J., Rupprecht C. E., Steinkellner H., Pauly M., Zeitlin L., Whaley K., Chikwamba R. Efficient In Vitro and In Vivo Activity of Glyco-Engineered Plant-Produced Rabies Monoclonal Antibodies E559 and 62-71-3 // PLoS One. – 2016. – Т. 11, № 7. – С. e0159313.

58. Matsumoto T., Yamada K., Noguchi K., Nakajima K., Takada K., Khawplod P., Nishizono A. Isolation and characterization of novel human monoclonal antibodies possessing neutralizing ability against rabies virus // Microbiol Immunol. – 2010. – Т. 54, № 11. – С. 673-83.

59. Zhao X. L., Yin J., Chen W. Q., Jiang M., Yang G., Yang Z. H. Generation and characterization of human monoclonal antibodies to G5, a linear neutralization epitope on glycoprotein of rabies virus, by phage display technology // Microbiol Immunol. – 2008. – Т. 52, № 2. – С. 89-93.

60. Lafon M., Wiktor T. J., Macfarlan R. I. Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies // J Gen Virol. – 1983. – Т. 64 (Pt 4). – С. 843-51.

61. Muller T., Dietzschold B., Ertl H., Fooks A. R., Freuling C., Fehlner-Gardiner C., Kliemt J., Meslin F. X., Franka R., Rupprecht C. E., Tordo N., Wanderler A. I., Kieny M. P. Development of a mouse monoclonal antibody cocktail for post-exposure rabies prophylaxis in humans // PLoS Negl Trop Dis. – 2009. – Т. 3, № 11. – С. e542.

62. Kuzmina N. A., Kuzmin, I.V., Ellison, J.A., and Rupprecht, Ch.E. . Conservation of binding epitopes for Monoclonal Antibodies on the rabies virus glycoprotein // J. Antivir. Antiretrovir. – 2013. – Т. 5. – С. 37–43.

63. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature. – 1975. – Т. 256, № 5517. – С. 495-7.

64. Hwang W. Y., Foote J. Immunogenicity of engineered antibodies // Methods. – 2005. – Т. 36, № 1. – С. 3-10.

65. Беневоленский С. В., Зацепин, С.С., Клячко, Е.В., Морозкина, Е.В., Позднякова, Л.П., Свешников, П.Г., Солопова, О.Н., Шемчукова, О.Б., Ягудин, О.Б. . Гуманизированные антигенсвязывающие фрагменты (Fab) против вируса бешенства, изолированный фрагмент днк, кодирующий Fab против вируса бешенства, клетка дрожжей, трансформированная фрагментом днк, и способ получения Fab против вируса бешенства с использованием дрожжей // Book Гуманизированные антигенсвязывающие фрагменты (Fab) против вируса бешенства, изолированный фрагмент днк, кодирующий Fab против вируса бешенства, клетка дрожжей, трансформированная фрагментом днк, и способ получения Fab против вируса бешенства с использованием дрожжей / Editor. – Russia, 2012.

66. BV C. H. A Randomized Phase II Trial to Compare the Safety and Neutralizing Activity of CL184 in Combination With Rabies Vaccine vs. HRIG or Placebo in Combination With Rabies Vaccine in Healthy Adult Subjects. Available from // Book A Randomized Phase II Trial to Compare the Safety and Neutralizing Activity of CL184 in Combination With Rabies Vaccine vs. HRIG or Placebo in Combination With Rabies Vaccine in Healthy Adult Subjects. Available from / Editor, 2011.

67. BV C. H. Randomized Phase II Trial on Safety and Neutralizing Activity of CL184 and Rabies Vaccine Versus Human Rabies Immune Globulin (HRIG) and Rabies Vaccine in Children and Adolescents. Available from: // Book Randomized Phase II Trial on Safety and Neutralizing Activity of CL184 and Rabies Vaccine Versus Human Rabies Immune Globulin (HRIG) and Rabies Vaccine in Children and Adolescents. Available from: / Editor, 2012.

68. BV C. H. Rabies Virus Neutralizing Activity and Safety of CL184, a Monoclonal Antibody Cocktail, in Simulated Rabies Post-Exposure Prophylaxis in Healthy Adults // Book Rabies Virus Neutralizing Activity and Safety of CL184, a Monoclonal Antibody Cocktail, in Simulated Rabies Post-Exposure Prophylaxis in Healthy Adults / Editor, 2013.

69. Ltd S. I. o. I. Phase II/III, Randomized, Multi-centric, Comparator-controlled Study of the Safety and Neutralizing Activity of a Human Monoclonal Antibody to Rabies (SII RMAb) Administered in Conjunction with Rabies Vaccine for Post-exposure Prophylaxis in

Patients following Potential Rabies Exposure // Book Phase II/III, Randomized, Multi-centric, Comparator-controlled Study of the Safety and Neutralizing Activity of a Human Monoclonal Antibody to Rabies (SII RMAb) Administered in Conjunction with Rabies Vaccine for Post-exposure Prophylaxis in Patients following Potential Rabies Exposure / Editor, 2012.

70. Ikonomou L., Schneider Y. J., Agathos S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins // Appl Microbiol Biotechnol. – 2003. – Т. 62, № 1. – С. 1-20.

71. Ko K., Tekoah Y., Rudd P. M., Harvey D. J., Dwek R. A., Spitsin S., Hanlon C. A., Rupprecht C., Dietzschold B., Golovkin M., Koprowski H. Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003. – Т. 100, № 13. – С. 8013-8.

72. Davis G. T., Bedzyk W. D., Voss E. W., Jacobs T. W. Single chain antibody (SCA) encoding genes: one-step construction and expression in eukaryotic cells // Biotechnology (N Y). – 1991. – Т. 9, № 2. – С. 165-9.

73. Zsebo K. M., Lu H. S., Fieschko J. C., Goldstein L., Davis J., Duker K., Suggs S. V., Lai P. H., Bitter G. A. Protein secretion from Saccharomyces cerevisiae directed by the prepro-alpha-factor leader region // J Biol Chem. – 1986. – Т. 261, № 13. – С. 5858-65.

74. Humphreys D. P., Chapman A. P., Reeks D. G., Lang V., Stephens P. E. Formation of dimeric Fabs in Escherichia coli: effect of hinge size and isotype, presence of interchain disulphide bond, Fab' expression levels, tail piece sequences and growth conditions // J Immunol Methods. – 1997. – Т. 209, № 2. – С. 193-202.

75. Levy R., Weiss R., Chen G., Iverson B. L., Georgiou G. Production of correctly folded Fab antibody fragment in the cytoplasm of Escherichia coli trxB gor mutants via the coexpression of molecular chaperones // Protein Expr Purif. – 2001. – Т. 23, № 2. – С. 338-47.

76. Свешников П. Г., Ягудин, Т.А., Морозкина, Е.В., Клячко, Е.В., Зацепин, С.С., Беневоленский, С.В., Шемчукова, О.Б., Позднякова, Л.П., Солопова, О.Н. // Вестник Московского университета. – 2010. – Т. 51. – С. 185-190.

77. Bakker A. B., Marissen, W. E. Liquid Anti-Rabies Antibody Formulations // Book Liquid Anti-Rabies Antibody Formulations / Editor. – USA, 2011.

78. Хлябич Г. Н., Дубинкин, И.В., Донсков, С.И., Суханов, Ю.С., Персанова, Л.В. Усовершенствованная технология получения моноклональных антител для определения

трансфузионно опасных антигенов эритроцитов // Вестник службы крови России. – 2010. – Т. 1. – С. 5-9.

79. Dietzschold B., Cox J. H., Schneider L. G., Wiktor T. J., Koprowski H. Isolation and purification of a polymeric form of the glycoprotein of rabies virus // J Gen Virol. – 1978. – Т. 40, № 1. – С. 131-9.

80. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Т. 227, № 5259. – С. 680-5.

81. Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohaniance L., Goldberg M. E. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay // J Immunol Methods. – 1985. – Т. 77, № 2. – С. 305-19.

82. Protein interactions. / Klotz I. M. – New York: Academic press, 1953.

83. Tijssen P., Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays // Anal Biochem. – 1984. – Т. 136, № 2. – С. 451-7.

84. Cliquet F., Aubert M., Sagne L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody // J Immunol Methods. – 1998. – Т. 212, № 1. – С. 79-87.

85. Laboratory techniques in rabies. / Aubert M. F. A. – 4th изд. – Geneva: World Health Organization, 1996.

86. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. / Committee N. R. C. U. – 8 изд. – Washington (DC): National Academies Press (US), 2011.

87. Методы лабораторных исследований по бешенству. / здравоохранения В. о. – 3-е изд. – Женева: ВОЗ, 1975. – 360 с.

88. Jones P. T., Dear P. H., Foote J., Neuberger M. S., Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse // Nature. – 1986. – Т. 321, № 6069. – С. 522-5.

89. Hooper D. C., Morimoto K., Bette M., Weihe E., Koprowski H., Dietzschold B. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system // J Virol. – 1998. – Т. 72, № 5. – С. 3711-9.

90. Drew P. D., Moss M. T., Pasieka T. J., Grose C., Harris W. J., Porter A. J. Multimeric humanized varicella-zoster virus antibody fragments to gH neutralize virus while monomeric fragments do not // J Gen Virol. – 2001. – Т. 82, № Pt 8. – С. 1959-63.

91. Hultberg A., Temperton N. J., Rosseels V., Koenders M., Gonzalez-Pajuelo M., Schepens B., Ibanez L. I., Vanlandschoot P., Schillemans J., Saunders M., Weiss R. A., Saelens X., Melero J. A., Verrips C. T., Van Gucht S., de Haard H. J. Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules // PLoS One. – 2011. – Т. 6, № 4. – С. e17665.

92. Presta L. G. Molecular engineering and design of therapeutic antibodies // Curr Opin Immunol. – 2008. – Т. 20, № 4. – С. 460-70.

93. Salfeld J. G. Isotype selection in antibody engineering // Nat Biotechnol. – 2007. – Т. 25, № 12. – С. 1369-72.

94. Jefferis R. Antibody therapeutics: isotype and glycoform selection // Expert Opin Biol Ther. – 2007. – Т. 7, № 9. – С. 1401-13.

95. Alyanakian M. A., Bernatowska E., Scherrmann J. M., Aucouturier P., Poplavsky J. L. Pharmacokinetics of total immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses in patients undergoing replacement therapy for primary immunodeficiency syndromes // Vox Sang. – 2003. – Т. 84, № 3. – С. 188-92.

96. Талаев В. Ю., Талаева, М.В., Воронина, Е.В., Заиченко, И.Е. Оценка эффективности рекомбинантных цитокинов человека отечественного производства (sci-store.ru) при получении моноцитарных дендритных клеток // Медицинская иммунология. – 2018. – Т. 4, № 20. – С. 535-542.

97. Smith S. A., Crowe J. E., Jr. Use of Human Hybridoma Technology To Isolate Human Monoclonal Antibodies // Microbiol Spectr. – 2015. – Т. 3, № 1. – С. AID-0027-2014.

98. Kalantarov G. F., Rudchenko S. A., Lobel L., Trakht I. Development of a fusion partner cell line for efficient production of human monoclonal antibodies from peripheral blood lymphocytes // Hum Antibodies. – 2002. – Т. 11, № 3. – С. 85-96.

99. Ostberg L., Pursch E. Human X (mouse X human) hybridomas stably producing human antibodies // Hybridoma. – 1983. – Т. 2, № 4. – С. 361-7.

100. Kabat E.A., Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S., K. C. Sequences of proteins of immunological interest // U.S Department of Health and Human Services, PHS, NIH, Bethesda. – 1991.

101. Zufferey R., Dull T., Mandel R. J., Bukovsky A., Quiroz D., Naldini L., Trono D. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery // J Virol. – 1998. – Т. 72, № 12. – С. 9873-80.

102. Schlatter S., Stansfield S. H., Dinnis D. M., Racher A. J., Birch J. R., James D. C. On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells // Biotechnol Prog. – 2005. – Т. 21, № 1. – С. 122-33.

103. Irie T., Kawai A. Further studies on the mechanism of rabies virus neutralization by a viral glycoprotein-specific monoclonal antibody, #1-46-12 // Microbiol Immunol. – 2005. – Т. 49, № 8. – С. 721-31.

104. de Kruif J., Bakker A. B., Marissen W. E., Kramer R. A., Throsby M., Rupprecht C. E., Goudsmit J. A human monoclonal antibody cocktail as a novel component of rabies postexposure prophylaxis // Annu Rev Med. – 2007. – Т. 58. – С. 359-68.

105. Bakker A. B., Marissen W. E., Kramer R. A., Rice A. B., Weldon W. C., Niezgoda M., Hanlon C. A., Thijsse S., Backus H. H., de Kruif J., Dietzschold B., Rupprecht C. E., Goudsmit J. Novel human monoclonal antibody combination effectively neutralizing natural rabies virus variants and individual in vitro escape mutants // J Virol. – 2005. – Т. 79, № 14. – С. 9062-8.

106. Flamand A., Raux H., Gaudin Y., Ruigrok R. W. Mechanisms of rabies virus neutralization // Virology. – 1993. – Т. 194, № 1. – С. 302-13.

107. Gaudin Y., Ruigrok R. W., Tuffereau C., Knossow M., Flamand A. Rabies virus glycoprotein is a trimer // Virology. – 1992. – Т. 187, № 2. – С. 627-32.

108. Gupta P. K., Sharma S., Walunj S. S., Chaturvedi V. K., Raut A. A., Patial S., Rai A., Pandey K. D., Saini M. Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus // Vet Microbiol. – 2005. – Т. 108, № 3-4. – С. 207-14.

109. Sissoeff L., Mousli M., England P., Tuffereau C. Stable trimerization of recombinant rabies virus glycoprotein ectodomain is required for interaction with the p75NTR receptor // J Gen Virol. – 2005. – Т. 86, № Pt 9. – С. 2543-52.

110. Shiota S., Mannen K., Matsumoto T., Yamada K., Yasui T., Takayama K., Kobayashi Y., Khawplod P., Gotoh K., Ahmed K., Iha H., Nishizono A. Development and evaluation of a rapid neutralizing antibody test for rabies // J Virol Methods. – 2009. – Т. 161, № 1. – С. 58-62.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность моим научным руководителям к.х.н. Алиеву Теймуру Кантамировичу и д.б.н. Долгих Дмитрию Александровичу за неоценимую помощь в выполнении данной работы, за важные практические рекомендации, поддержку и обсуждение результатов.

Также благодарю Ларину Марию Викторовну за помощь в планировании экспериментов, полезные замечания и дружеское участие.

Автор выражает признательность сотрудникам отдела биоинженерии ИБХ РАН, соавторам и коллабораторам, в особенности к.б.н. Солоповой Ольге Николаевне за помощь в проведении экспериментов и дискуссию.

Автор благодарит Т.В. Гребенникову (ФГБУ “Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи” МЗ РФ, Москва) за помощь в проведении теста FAVN и Л.В. Гмыль (ФГБУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН) за помощь в проведении интрацеребрального теста на мышах.

Автор благодарит родных за поддержку и веру, проявленную при подготовке работы.