

На правах рукописи

ШАНЬШИН ДАНИИЛ ВАСИЛЬЕВИЧ

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ
ШИРОКОРЕАКТИВНОГО ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА 10Н10
СПЕЦИФИЧНОГО К Е БЕЛКУ ОРТОФЛАВИВИРУСОВ**

1.5.3 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2025

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: **Щербаков Дмитрий Николаевич,**
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные оппоненты: **Гуляева Людмила Федоровна,**
доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФГБУН «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Ведущая организация: **Хаснатинов Максим Анатольевич**
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»
ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «19» сентября 2025 г. в 12-00 на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
доцент

Т.Н. Ильичева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Orthoflaviviruses – это род одноцепочечных (+) РНК-содержащих вирусов из семейства *Flaviviridae*, включающий такие смертельно опасные для человека вирусы, как вирус денге (DENV1-4), вирус Зика (ZIKV), вирус желтой лихорадки (YFV), вирус Западного Нила (WNV), вирус японского энцефалита (JEV) и вирус клещевого энцефалита (TBEV). Данные вирусы могут вызывать различные формы течения заболеваний, в число которых входят геморрагическая лихорадка и энцефалит. Тяжелое течение заболевания нередко заканчивается летальным исходом (Misra UK, et al., 2015, Mota TDO, et al., 2019). Особенностью этих вирусов является высокая степень гомологии их геномов и, соответственно, структурных белков, что обуславливает схожие антигенные свойства. Большой проблемой в случае ортофлавивирусов является феномен антителизависимого усиления (ADE) вторичных инфекций (Chan KR, et al., 2016, Katzelnick LC, 2020).

Несмотря на высокую опасность, для профилактики ортофлавивирусных инфекций создано ограниченное число разрешенных к применению аттенуированных (YFV), инаktivированных вакцин (JEV и TBEV) и рекомбинантных (Castilho L.R., et al., 2022). Использование сывороточной терапии или препаратов моноклональных антител нередко сталкивается с ограничениями в виде развития у пациентов ADE, поэтому востребованы альтернативные подходы. Одним из таких подходов может выступать адресная доставка противовирусных препаратов с использованием антигенраспознающих доменов антител с известной эпитопной специфичностью.

В настоящее время основными методами изучения структуры линейных эпитопов антител являются рентгеноструктурный анализ (Feng D, et al., 2010), технология фагового дисплея (Marc G, et al., 2018) и методы, использующие сайт-направленный мутагенез (Gershoni JM, et al., 2007). Применение этих подходов позволяет определить область контакта паратопа антитела с эпитопом антигена. Однако следует отметить, что использование некоторых из этих методов, в первую очередь рентгеноструктурного анализа, требует значительных временных затрат и определенных навыков в работе, и для относительно простых задач, таких как изучение линейных эпитопов, его использование нецелесообразно. Для таких эпитопов проще использовать такие методы, как PepScan и технология фагового дисплея (Marc G, et al., 2018, Jin Z et al., 2021, Sikora M, 2021).

Использование антител для адресной доставки даже с известной эпитопной специфичностью может столкнуться с ограничениями в виде

иммунологического отторжения. Частичное решение этой проблемы возможно за счет получения рекомбинантных химерных антител. Химеризация иммуноглобулинов подразумевает замену константных областей антител одного вида на аналогичную область другого вида, в частности человеческого происхождения. Химеризация антитела является нетривиальной задачей и требует всестороннего изучения как донорного антитела, так и полученных вариантов.

Цель диссертационной работы заключалась в изучении свойств широкореактивного МКА 10Н10 специфичного к Е белку ортофлавириусов, создании его химерного варианта (10Н10ch) и сравнение иммунохимических свойств мышиноного и химерного антитела.

Задачи исследования:

1. Получить панель рекомбинантных белков ортофлавириусов (TBEV, ZIKV, WNV и DENV) для уточнения локализации эпитопа мышиноного моноклонального антитела 10Н10.

2. Определить аминокислотный состав переменных доменов антитела 10Н10.

3. Построить трехмерную модель комплекса переменных доменов тяжелой и легкой цепи антитела 10Н10 и проанализировать взаимодействие смоделированного комплекса с поверхностным белком Е ортофлавириусов.

4. Провести картирование эпитопа антитела 10Н10 с помощью комбинаторной фаговой библиотеки.

5. Получить химерное антитело 10Н10ch, состоящее из переменных доменов мышиноного антитела и константных – человеческого, и изучить его иммунохимические свойства.

Научная новизна полученных результатов и практическая значимость работы. Для локализации эпитопа антитела 10Н10 впервые была получена панель рекомбинантных антигенов четырех ортофлавириусов, включающая в себя фрагменты оболочечного белка Е и неструктурный белок 1 TBEV, а также фрагменты оболочечного белка WNV, DENV и ZIKV. Впервые было проведено комплексное исследование мышиноного моноклонального антитела 10Н10. Определена аминокислотная последовательность легкой и тяжелой цепи антитела и на их основе построена трехмерная модель комплекса VH и VL. На основании полученного комплекса VH/VL впервые было проведено молекулярное моделирование антитела 10Н10 с фрагментами оболочечного белка TBEV и ZIKV. Продемонстрировано, что наиболее энергетически выгодным расположением комплекса VH/VL относительно поверхностного белка является такое, при котором происходит сближение паратопа антитела с областью петли слияния белка ортофлавириусов. Впервые методом фагового дисплея определена первичная структура эпитопа антитела

10H10. Впервые на основе аминокислотной последовательности переменных доменов антитела 10H10 проведен дизайн химерного антитела, включающего константные области человеческого антитела. Был сконструирован интеграционный вектор pVEAL3-10H10ch, трансфекция которым клеток CHO-K1 позволила получить продуцент химерного антитела 10H10ch. При помощи метода биослойной интерферометрии впервые определены константы диссоциации мышинового и химерного антитела 10H10.

В данном исследовании получена панель рекомбинантных фрагментов полипротеина ортофлавиринов, таких как TBEV, ZIKV, DENV и WNV. Такие антигены можно использовать как для фундаментальных исследований, так и для анализа специфичного гуморального иммунного ответа.

Впервые изучена нуклеотидная последовательность и получена аминокислотная последовательность переменных доменов антитела 10H10. Последовательности были депонированы в базе GenBank (VH OK483332; VL OL448869). Результат позволил получить рекомбинантный аналог антитела 10H10.

В работе предложена схема комплексного изучения линейных антигенных детерминант антител. При помощи этого подхода получена первичная структура эпитопа антитела 10H10, построена трехмерная модель антитела с эпитопом и предсказана структура наиболее энергетически выгодной конформации комплекса «антиген-антитело». Такой подход можно использовать для поиска и исследования линейных эпитопов других антител.

Сконструирован интеграционный вектор pVEAL3-10H10ch и получен стабильный продуцент химерного антитела 10H10ch. Разработанный вектор может быть использован для получения рекомбинантных антител, специфичных в отношении любых других антигенов. Полученное рекомбинантное антитело может быть использовано для создания диагностических тест-систем и терапевтических препаратов широкого спектра действия. Получен патент на изобретение РФ №2800471 от 13.10.2022 г.

Предложен метод определения аффинности антител различного происхождения на основе биослойной интерферометрии. Продemonстрировано, что константа диссоциации химерного антитела при взаимодействии с различными рекомбинантными антигенами находится в наномолярной области.

Методология и методы исследования.

Достижение поставленной цели осуществлялось путем комплексного подхода к решению задач с использованием набора классических и современных методов исследования, включая методы молекулярной

биологии и физико-химического анализа. Результаты были получены при помощи молекулярно-биологических (выделение нуклеиновых кислот, трансформация, секвенирование методом Сэнгера, ферментативный гидролиз, лигирование, фаговый дисплей, обратная транскрипция, трансфекция, аффинная хроматография и др.), иммунохимических методов (иммунноферментный анализ, дот-блот, вестрн-блот) и методов биоинформатического анализа (моделирование трехмерной структуры, молекулярный докинг и др., сборка и анализ полногеномных последовательностей, филогенетический и эволюционный анализ). Эксперименты проводили не менее чем в трехкратной повторности. Для статистической обработки данных использовали параметрический t-критерий Стьюдента. Достоверным считали различия при уровне значимости $p < 0,05$. Расчет результатов осуществляли с помощью пакетов прикладных программ GraphPad Prism.

Основные положения, выносимые на защиту

1. С использованием разработанной панели рекомбинантных белков, содержащих фрагменты полипротеина ортофлавириусов, локализован эпитоп, с которым взаимодействует антитело 10H10.

2. Расшифрованные аминокислотные последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепи мышинового антитела 10H10, депонированные в базе GenBank (VH OK483332; VL OL448869), позволяют построить теоретическую трехмерную модель комплекса переменных доменов.

3. Отобранные фаготопы, частично совпадающие по составу с аминокислотной последовательностью пептида слияния поверхностного белка ортофлавириусов, специфически взаимодействуют с антителом 10H10 в иммуноферментном анализе.

4. Полученное химерное антитело 10H10ch, взаимодействует с рекомбинантными антигенами (TBEV, ZIKV, WNV и DENV) с Kd в диапазоне 10 – 48 нМ.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов подтверждена статистической обработкой полученных данных. Результаты всех экспериментов получены с использованием сертифицированного оборудования и современных молекулярно-биологических, иммунологических и иммунохимических методов.

Положения и выводы являются научно обоснованными. Полученные результаты являются достоверными и опираются на экспериментальные и литературные данные. Результаты диссертационной работы были представлены на международной конференции OpenBio (Кольцово, 2016, 2017, 2022 г.), I Международном научном форуме студентов и молодых ученых и Третьей международной молодежной биотехнологической школе «Рекомбинантные белки и вакцины» (Барнаул, 2017), 4-й Научно-

практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Нижний Новгород, 2018).

Результаты работы отражены в 15 публикациях в отечественных и зарубежных изданиях, из которых: 6 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций, 9 тезисов, докладов на всероссийских и международных конференциях. Также получен патент на изобретение РФ №2800471 от 13.10.2022 г.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 142 страницах машинописного текста, включает 31 рисунок и 8 таблиц, а также 9 приложений. Библиография включает 297 наименований.

Личный вклад автора. Автор самостоятельно выполнил представленные в диссертации эксперименты. Основные результаты исследований получены и проанализированы лично автором. Работы, связанные с проведением молекулярного докинга, проводились автором совместно с д.х.н. Борисевич С.С. (Уфимский институт химии УФИЦ РАН). Работы, связанные с вирусами, проводились к.б.н. Протопоповой Е.В. (ФБУН ГИЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Работы по наращиванию химерного антитела проводились совместно с Несмеяновой В.С. (ФБУН ГИЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Секвенирование образцов ДНК, кодирующих матрицы и целевые гены, проведены в центре коллективного пользования «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. Обзор литературы включает в себя несколько разделов и заключение. В первых разделах изложены общие сведения об ортофлавирусах, эпидемиологии и жизненном цикле вирусов. В следующих разделах кратко рассматриваются иммунологические механизмы противодействия ортофлавирусным инфекциям. Этот раздел включает в себя рассмотрение механизмов врожденного иммунитета, антителозависимого усиления инфекции, В- и Т-клеточного иммунного ответа. Далее следует раздел, в котором описывается феномен широкореактивных антител на примерах разных вирусных инфекций. В завершение рассматривается структура антитела и механизмы получения химерных антител.

Материалы и методы. Глава содержит описание материалов, использованных в работе, и методов молекулярной биологии, иммунологии и иммунохимии (получение генно-инженерных конструкций,

выделение мРНК *in vitro*, электрофорез белков и нуклеиновых кислот, ИФА, иммуноблотинг, индукция экспрессии белков, фаговый дисплей, хроматографическая очистка белков, определение значения констант диссоциации), методов работы с культурами клеток млекопитающих, методов биоинформатического анализа (моделирование трехмерных структур белков, молекулярный докинг), методов статистической обработки результатов.

Результаты исследования и обсуждение результатов. Раздел «Результаты и их обсуждение» представлен в виде пяти частей, в которых изложены все полученные результаты, приведены графики и рисунки. Первая часть описывает получение панели рекомбинантных белков ортофлавириусов для уточнения локализации эпитопа антитела 10Н10. Вторая и третья части посвящены расшифровке аминокислотных последовательностей варьируемых доменов легкой и тяжелой цепи антитела 10Н10 и построению на основе расшифрованной аминокислотной последовательности теоретической трехмерной модели комплекса этого антитела с поверхностным белком Е ортофлавириусов. Четвертая часть посвящена картированию эпитопа при помощи технологий фагового дисплея. Также проведен молекулярный докинг отобранных пептидов с антителом 10Н10. Пятая часть посвящена получению химерного антитела 10Н10сh и характеристике его некоторых иммунохимических свойств.

1. Получение панели рекомбинантных белков ортофлавириусов для локализации эпитопа, узнаваемого антителом 10Н10

Ранее было продемонстрировано, что антитело 10Н10 обладает перекрестной реактивностью в отношении рекомбинантных фрагментов полипротеина белка Е TBEV и WNV в ИФА и иммуноблотинге, при этом эпитоп является линейным (Protopopova E.V. et al. 1996, Bogachek M.V. et al. 2005). Феномен перекрестной реактивности вероятно обусловлен тем, что антитело взаимодействует с консервативной областью ортофлавириусов. Хотя несмотря на относительно высокую идентичность аминокислотной последовательности ортофлавириусов, не все регионы имеют протяженные участки гомологии. Только два региона имеют высокую степень идентичности. Первый находится в области «ножки», а второй входит в состав домена II и представлен петлей слияния (fusion loop, FL). Поэтому для уточнения локализации эпитопа было решено получить панель рекомбинантных антигенов, включающих различные регионы полипротеина ортофлавириусов, и, с использованием ИФА, провести анализ реактивности.

Для проведения иммунохимических анализов было решено получить рекомбинантные белки, включающие примерно равные фрагменты оболочечного белка и полноразмерный белок NS1: TEF1 (S281-R467*), TEF2 (V468-T590*), TEF3 (K591-S727*), а также белок, включающий

область неструктурного белка 1 (NS1, D777-A1128*). Кроме того, были получены фрагменты полипротеинов других ортофлавириусов, чья последовательность включала регион поверхностного белка, аналогичный TEF1 (рисунок 1).

* - нумерация от первого аминокислотного остатка в полипептидной цепочке полипротеина

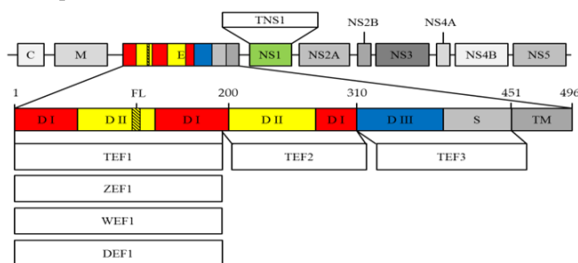


Рисунок 1. Схема регионов полипротеина ортофлавириусов, использованных в работе.

C – капсидный белок, M – мембранный белок, E – оболочечный белок, NS1-NS5 – семь неструктурных белков, D I – домен I, D II –

домен II, D III – домен III, S – «ножка», TM – трансмембранный регион, TEF1, ZEF1, WEF1, DEF1 – фрагмент оболочечного белка ортофлавириусов, включающий 1 – 184-187 а.о.; TEF2 – фрагмент оболочечного белка TBEV, включающий 188 – 310 а.о.; TEF3 – фрагмент оболочечного белка TBEV, включающий 311 – 451 а.о.; TNS1 – полноразмерный белок NS1 TBEV.

Для получения рекомбинантных плазмидных ДНК, обеспечивающих экспрессию фрагментов белка E ортофлавириусов в клетках *E.coli*, был выбран вектор pET32. На основе вектора pET32 были получены конструкции, кодирующие белок носитель (тиоредоксин A) и слитый с ним фрагмент полипротеина ортофлавириусов, несущий на С-конце гексагиститиновую метку.

Для амплификации генов, кодирующих фрагменты полипротеина ортофлавириусов были рассчитаны прямые и обратные праймеры, содержащие сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции Bsp19I и Sfr274I соответственно. В качестве матрицы были использованы синтезированные нуклеотидные последовательности, кодирующие полноразмерные оболочечный белок (gE TBEV) и неструктурный белок 1 (gTNS1), а также фрагменты оболочечных белков ортофлавириусов (gZEF1, gWEF1, gDEF1).

Полученными плазидами pET32+gTEF1, pET32+gTEF2, pET32+gTEF3, pET32+gTNS1, pET32+gZEF1, pET32+gWEF1, pET32+gDEF1 проводили трансформацию клеток *E.coli* штамма BL21(DE3). Клетки-продуценты инокулировали в жидкую питательную среду LB. Нарботку рекомбинантных белков проводили при 30 °C в течение 16 часов после добавления до конечной концентрации 0,5 мМ ИПТГ.

Для очистки белков использовали металл-хелатную аффинную хроматографию с использованием IMAC сефарозы. Препараты рекомбинантных белков обладали выходом не менее 30 мг с 1 литра культуры и чистотой не менее 90%. Анализ препаратов рекомбинантных белков проводили при помощи электрофоретического разделения белков в 12 % полиакриламидном геле.

Полученные белки были использованы для проведения иммунохимического анализа специфичности взаимодействия антитела 10Н10.

Для работы использовали 2 мкг/мл мышиноного моноклонального антитела 10Н10, полученного из одноименной гибридомной линии клеток. Для этого асцитная жидкость осветлялась от клеток при помощи центрифугирования. Далее асцит разбавлялся ФСБР в соотношении 1:2. Очистка от примесных белков осуществлялась с использованием аффинной хроматографии на сорбенте MabSelect SURE (GE Healthcare). Контроль наличия целевого белка в анализируемом образце проводили при помощи электрофоретического разделения белков в денатурирующих условиях в 12 % полиакриламидном геле по методу Лэммли (Laemmli U.K., 1970).

Анализ сродства антитела 10Н10 с препаратами очищенных рекомбинантных белков проводили с использованием дот-блот анализа, вестрн-блот анализа и ИФА. В результате было показано, что антителу 10Н10 реактивно в отношении белков TEF1, WEF1, ZEF1 и DEF1. При этом реактивность сохраняется если белки денатурированы и сохраняют линейные эпитопы.

При проведении ИФА высокое значение оптической плотности наблюдали для белка TEF1 ($p=0.0111$, расчет проводился с использованием критерия Краскала – Уоллиса). И в то же время для белков TEF2, TEF3, TNS1 уровень сигнала достоверно не отличался от фонового (Рисунок 2 А).

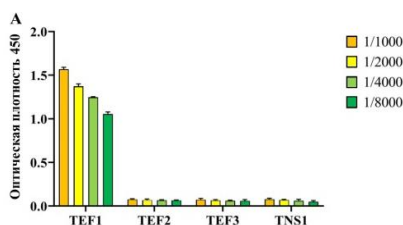
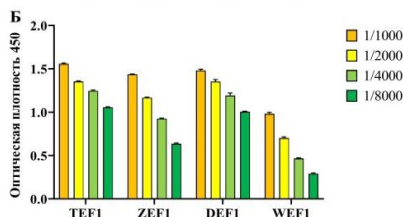


Рисунок 2. Иммуноферментный анализ взаимодействия мышиноного моноклонального антитела 10Н10 с фрагментами полипротеина TBEV. Расчет статистической значимости проводился с использованием критерия Краскала – Уоллиса $p=0.0111$, ($p>0.05$ – статистически незначимый результат).



ИФА с рекомбинантными белками ZEF1, WEF1, DEF1, включающими первые ~190 а.о. поверхностного белка ZIKV, WNV и DENV соответственно, показал

значения оптической плотности, сравнимые с полученными для TEF1 (Рисунок 2 Б).

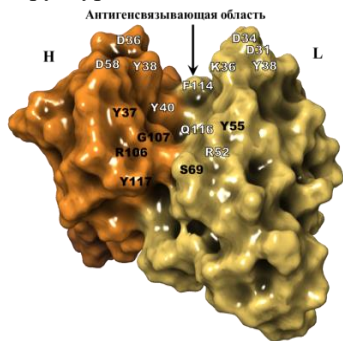
Полученные результаты указывают на то, что предположительным регионом локализации эпитопа является N-концевой фрагмент поверхностного белка ортофлавириусов. Только белки ZEF1, WEF1, DEF1 и TEF1 взаимодействовали с антителом.

2. Расшифровка аминокислотных последовательностей переменных доменов антитела 10H10 и построение теоретической трехмерной модели их комплекса

Для расшифровки аминокислотной последовательности переменных доменов антитела 10H10 было проведено секвенирование кДНК, полученной на основе мРНК одноименной гибридомы. Для этого выделяли суммарную РНК из гибридомных клеток и проводили обратную транскрипцию со специфическими праймерами – для тяжелой цепи с шестью вырожденными позициями нуклеотидов (AbHC_MH1_F) и для легкой цепи с семью вырожденными позициями нуклеотидов (AbLC_5XMk_F). Амплификацию фрагментов кДНК соответствующих VH и VL проводили, используя пары специфических праймеров (AbHC_MH1_F в паре с AbHC_mIgG2B_R или AbLC_5XMk_F и AbLC_3XKc_R). Полученные ПЦР-продукты клонировали с помощью CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США) с последующей наработкой плазмидной ДНК и секвенированием нескольких клонов для каждого ПЦР-фрагмента по Сэнгеру. Анализ последовательностей, соответствующих кДНК, позволил вывести открытые рамки считывания и аминокислотные последовательности VH и VL (VH GenBank number OK483332, VL GenBank number OL448869).

Таким образом, были получены аминокислотные последовательности переменных доменов антител 10H10, что позволило провести моделирование трехмерной структуры их комплекса.

Трехмерная модель переменных доменов антитела 10H10 была создана с помощью инструментов SAbPred (Dunbar J et al. 2016). Трехмерная структура доменов 10H10 VH и VL базировалась на существующем шаблоне VH/VL из базы данных SAbPred. С использованием шаблона с идентичностью структуры не менее 80 % структура VH и VL была смоделирована в пределах 1Å



среднеквадратичного отклонения (RMSD) при доверительном интервале 75 %. Полученная модель комплекса переменных доменов 10H10 (рисунок 3) была использована в дальнейших работах. **Рисунок 3.** 3D-модель комплекса VH и VL антитела 10H10: аминокислотные остатки,

предположительно реагирующие с регионом петли слияния белка E, отмечены белым цветом (здесь и далее H и L — название цепи).

Уточнение качества полученной модели проводили с использованием пакета программ Schrodinger Suite: Release 2021-1 (Bhachoo J. et al., 2017), при этом анализ карт Рамачандрана указывал на высокое качество структур комплекса VH и VL. Более 80 % аминокислотных остатков комплекса имели правильные углы ϕ и ψ , которые располагались в допустимых областях.

3. Построение комплекса вариабельных доменов антитела 10H10 с поверхностным белком E ортофлавивирусов

Для моделирования комплекса антиген – антитело было решено использовать поверхностный белок E вирусов TBEV (код PBD 1SVB) и ZIKV (код PDB 5H37), чьи структуры были загружены из банка данных белков PDB.

Оценку потенциала образования комплекса между VH-VL антитела 10H10 и поверхностного белка E проводили методом молекулярного белок-белкового докинга. Выбор активного пространства для построения модели базировался на результатах иммунохимических тестов (рисунок 2), позволивших выбрать регион, включающий первые 180 аминокислотных остатков E белка. Центром активного пространства была выбрана область между цистеинами C92 – C116, соответствующая петле слияния. В ходе молекулярного докинга было проведено несколько расчетов, соответствующих различному положению комплекса 10H10-VH/VL относительно белка E TBEV и ZIKV. Оказалось, что энергетически более выгодным расположением белков относительно друг друга являются позиции, при которых петли слияния поверхностных белков E расположены внутри пространства между двумя цепями антитела 10H10.

Анализ взаимодействия 10H10 с оболочечными белками ортофлавивирусов в полученных вариантах комплексов (наиболее энергетически выгодных) характеризуется несколькими межмолекулярными взаимодействиями, при этом преобладают водородные мостики, солевые мостики и π - π стекинговые связи (таблица 1).

Таблица 1. Типы межмолекулярных взаимодействий, участвующих в формировании комплексов поверхностного гликопротеина ортофлавивирусов и антитела 10H10.

Гликопротеин	Участвующие аминокислотные остатки	
	H-связи	Другие взаимодействия
TBEV	D _A 98 и H _H 38; G _A 102 и Y _H 40; H _A 104 и D _L 31; T _A 76 и K _L 38	H _A 104 и F _L 114 – π - π стекинговые связи
ZIKV	R _A 99 и Y _H 40; R _A 99 и Q _L 116; G _A 104 и R _L 52; C _A 105 и R _L 52; K _A 251 и Y _L 38; S _A 72 и K _L 36	D _A 98 и K _L 38; K _A 110 и D _H 98; K _A 251 и D _L 31; K _A 251 и D _L 34 – солевые мостики; F _A 108 и Y _H 40 – π - π стекинговые связи

Примечание: А – аминокислотные остатки, ответственные за взаимодействие антигена с антителом; Н и L – аминокислотные остатки, ответственные за взаимодействие антитела с антигеном.

Совокупно результаты молекулярного моделирования показали, что моноклональное антитело 10Н10 может образовывать стабильные комплексы с участком петли слияния (C92-C116) белка E_{TBEV} и E_{ZIKV}, которые включают различные межмолекулярные взаимодействия, в том числе водородные связи, солевые мостики и π-π стекинг. Взаимодействие петли слияния E_{TBEV} с моноклональным антителом 10Н10, вероятно, является более гибким, о чем свидетельствует меньшее количество Н-связей, зарегистрированных при моделировании, в то время как распознавание области FL белка E_{ZIKV} моноклональным антителом 10Н10 обеспечивается большим количеством Н-связей.

4. Картирование эпитопа при помощи технологии фагового дисплея

Для картирования эпитопа антитела 10Н10 использовали 12-мерную фаговую пептидную библиотеку. После проведения трех раундов аффинной селекции было проанализировано 80 индивидуальных клонов, 60 были отобраны для дальнейшего анализа, остальные клоны имели в своем составе непрочитанные области или ошибки секвенирования. На основе нуклеотидной последовательности были выведены аминокислотные последовательности чужеродного пептида отобранных клонов (рисунок 4).

Название	Последовательность	Количество клонов	Рисунок 4. Выворачивание аминокислотных последовательностей области петли слияния ортофлавивирусов и пептидов, экспонированных на белке рIII отобранных фаговых клонов после трех раундов аффинной селекции с
TBEV*	KRDQSDRGWGNHCGLF ¹ FGKGSIVTCVK		
DENV1*	RRTLVD ² DRGWNGCG ³ LF ⁴ FGKGS ⁵ LITCAK		
ZIKV*	KRTLVD ⁶ DRGWNGCG ⁷ LF ⁸ FGKGS ⁹ LITCAK		
WNV*	KQGVVD ¹⁰ DRGWNGCG ¹¹ LF ¹² FGKGS ¹³ IDITCAK		
Реп FL	RDQSDRGWGNHCGLF ¹⁴ FGK		
Реп 1	GYAGWGN ¹⁵ SWGLF	28	
Реп 2	LPWGRWDAL ¹⁶ FG ¹⁷ R	1	
Реп 3	ALRYEGL ¹⁸ FGAPW	10	
Реп 4	SF ¹⁹ DRGLWGLWSM	9	
Реп 5	DYHDPSLPTLRK	1	
Реп 6	SGLNYSVPEVK ²⁰ N	1	

антителом 10Н10.

* - фрагмент последовательности вирусного полипротеина.

Сравнение аминокислотных последовательностей отобранных фаготопов показало, что среди них присутствуют варианты, содержащие аминокислотные остатки, частично совпадающие по последовательности с петлей слияния (рисунок 4). При этом некоторые фаговые клоны содержали идентичные последовательности, и были представлены во множестве копий GYAGWGN¹⁵SWGLF (28/60), ALRYEGL¹⁸FGAPW (10/60),

SFDRGLWGLWSM (9/60) и LPWGRWDALFGR (1/60). Путем сравнения отобранных пептидов можно выделить мотив DRGWGNXXGLFGR, где X соответствует любому аминокислотному остатку.

Для подтверждения взаимодействия отобранных фаготопов с антителом 10H10 было решено провести ИФА. Так как на взаимодействие эпитопа с антителом может оказывать влияние окружение эпитопа, кроме полученных бактериофагов, содержащих пептид в составе белка рIII, было решено получить нитчатые бактериофаги, содержащие отобранные пептиды в составе белка рVIII. На основании проведенного сравнительного анализа аминокислотных последовательностей, экспонированных на поверхности рIII белка бактериофагов, было отобрано четыре варианта аминокислотных последовательностей, наиболее сходных с петлей слияния (пер 1-4).

Для получения рекомбинантных бактериофагов, обеспечивающих экспонирование пептидов на белке рIII и рVIII, использовали фагмиду fth-1. Для встройки последовательностей генов, кодирующих отобранные пептиды, были подобраны олигонуклеотиды таким образом, чтобы при их гибридизации получались липкие концы сайта гидролиза BstXI и SfiI для получения бактериофагов типа р3 и р88 соответственно.

Для проведения ИФА в лунки иммунологического планшета сорбировали бактериофаги в количестве 10^{11} БОЕ/лунку. В качестве положительного контроля использовали рекомбинантный бактериофаг, экспонирующий пептид по аминокислотной последовательности, совпадающий с петлей слияния—94RDQSDRGWGNHCGFLFGKG111 (пер FL). В качестве отрицательного контроля использовали бактериофаг, не несущий рекомбинантную встройку (M13). После этого в лунки добавляли антитело, детекцию осуществляли при помощи конъюгата anti-mouse HRP (рисунок 5).

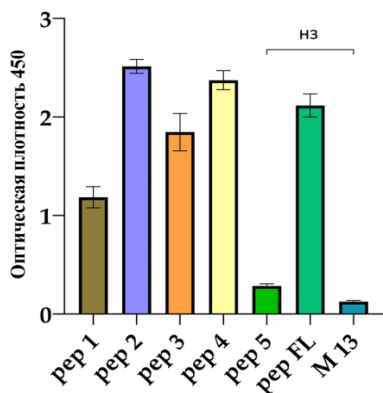


Рисунок 5. Результаты иммуноферментного анализа взаимодействия антитела 10H10 с бактериофагами. Тест Даннета множественных сравнений (значение $p < 0,0001$ – статистически значимая разница по сравнению с M13 (значение $p > 0,05$ (нз) – статистически незначимая разница по сравнению с M13). пер 1 – бактериофаг M13, содержащий последовательность GYAGWGNWSGLF в составе белка рIII; пер 2 – бактериофаг M13, содержащий последовательность LPWGRWDALFGR в составе белка рIII; пер 3 – бактериофаг M13, содержащий

последовательность ALRYEGLFGAPW в составе белка рIII; пер 4 – бактериофаг M13, содержащий последовательность SFDRGLWGLWSM в составе белка рIII; пер 5 – бактериофаг M13, содержащий последовательность DYNDPSLPTLRK в составе белка рIII; M13 – бактериофаг M13, не содержащий чужеродную вставку.

Для описания возможных характеристик взаимодействия пептидов с паротопом антитела 10H10 был проведен молекулярный докинг. По результатам докинга все пептиды располагаются в антигенсвязывающей области (рисунок 6) с образованием ряда межмолекулярных взаимодействий. Связывание пептидов сопровождается образованием ряда водородных связей между а.о. и дополнительных π - π стекиннг взаимодействий и солевых мостиков.

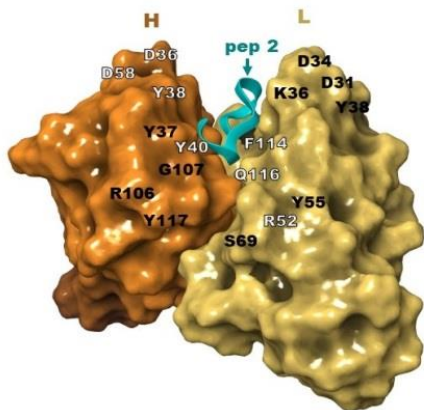


Рисунок 6. Расположение пер 2 в сайте связывания антитела 10H10.

Однако результат молекулярного докинга позволяет получить некоторую статическую, пусть и термодинамически устойчивую позицию.

Молекулярно-динамические симуляции позволяют оценить время удержания пептида в сайте связывания. Тогда для объяснения этих противоречий провели ряд молекулярно-динамических симуляций комплексов пер 1-

10H10, пер 2-10H10 и пер 5-10H10. Выбор именно этих пептидов был обусловлен тем что, пептид пер 1 имеет мотив, содержащий наибольшее количество аминокислотных остатков совпадающих с петлей слияния, для пер 2 – фиксируется наибольший уровень взаимодействия с антителом 10H10 в ИФА (рисунок 5), пер 5 – не содержит мотив аминокислотных остатков совпадающих с петлей слияния. Результат анализа контактов в комплексах пер 1-10H10 и пер 2-10H10 на всем протяжении МД симуляций позволяет выделить аминокислотные остатки, контакт с которыми носит наиболее продолжительный характер (рисунок 7). Сравнение их с ключевыми а.о., полученными после фагового дисплея, позволил найти пересекающиеся аминокислотные остатки W101, F108 и R110.

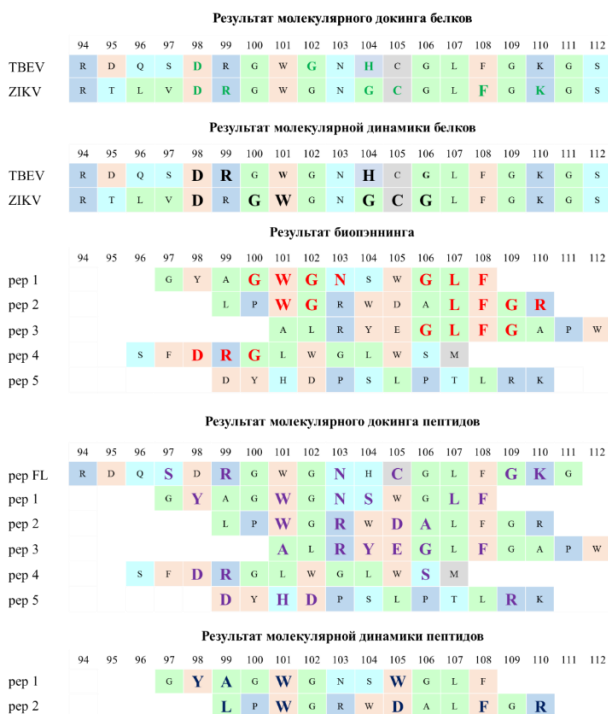


Рисунок 7. Выравнивание аминокислотных последовательностей, участвующих во взаимодействии с паротопом антитела 10Н10. Красным выделены ключевые аминокислотные остатки, выявленные при помощи аффинной селекции, зеленым выделены аминокислотные остатки, полученные в результате белок-белкового докинга, черным выделены аминокислотные остатки, полученные при помощи молекулярной динамики белков, фиолетовым выделены аминокислотные

остатки, полученные при помощи пептидного докинга, темно-синим выделены аминокислотные остатки, полученные при помощи молекулярной динамики пептидов.

Обобщая результаты изучения эпитопа антитела 10Н10, полученные как при помощи фагового дисплея, так и теоретических подходов можно отметить следующее. Для трех использованных подходов не удалось выявить общие аминокислотные остатки, потенциально участвующие во взаимодействии с антителом. Однако попарное сравнение такие остатки обнаруживает. Если вести сравнение результатов белок белкового докинга, молекулярной динамики и фагового дисплея, совпадающими оказываются аминокислотные остатки D98, R99, G100, W101, G102, G106 и F108. В случае сравнения ключевых аминокислотных остатков, выявленных при помощи пептидного докинга, молекулярной динамики и фагового дисплея, то совпадение обнаруживается для позиций W101, N103, G106, F108 и R110.

5. Получение химерного варианта антитела 10Н10 и изучение его некоторых свойств

Финальной частью работы стало получение на основе вариабельных доменов антитела 10H10 его химерного варианта. Для этого был проведен дизайн нуклеотидной последовательности, обеспечивающей при встройке в экспрессионный вектор синтез и секрецию полноразмерного химерного антитела.

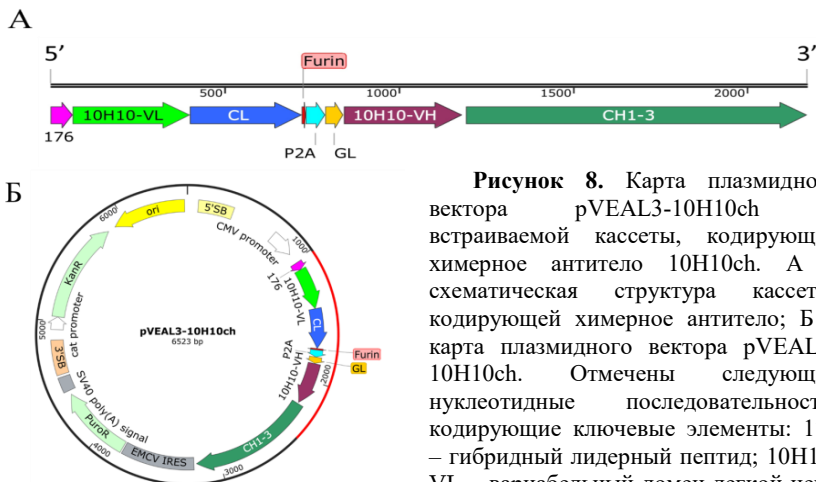


Рисунок 8. Карта плазмидного вектора pVEAL3-10H10ch и встраиваемой кассеты, кодирующей химерное антитело 10H10ch. А – схематическая структура кассеты, кодирующей химерное антитело; Б – карта плазмидного вектора pVEAL3-10H10ch. Отмечены следующие нуклеотидные последовательности, кодирующие ключевые элементы: 176 – гибридный лидерный пептид; 10H10-VL – вариабельный домен легкой цепи антитела 10H10; CL – константная часть легкой цепи антитела; Furin – сайт протеолиза фурина; P2A – саморасщепляющийся пептид p2a; GL – лидерная последовательность gaussia luciferase; 10H10-VH – вариабельный домен тяжелой цепи антитела 10H10; CH1-3 – константная цепь антитела человека IgG1 (CH1-CH2-CH3).

В итоге был получен интеграционный вектор pVEAL3-10H10ch (рисунок 8). Разработанный вектор содержит плечи интеграции транспозазы SB100, обеспечивающие высокую эффективность интеграции в геном-прививаемых клеток млекопитающих.

Культуру продуцента химерного антитела 10H10ch получали одновременной трансфекцией клеток CHO-K1 смесью плазмид pVEAL3-10H10ch и pCMV(CAT)T7-SB100, взятых в соотношении 1:10. Трансфекцию проводили при достижении плотности монослоя 80 % с помощью препарата Lipofectamine 3000 (ThermoFisher, США) согласно инструкции производителя.

Для получения препарата очищенного антитела 10H10ch культуральную среду осветляли при помощи центрифугирования с последующей хроматографической очисткой на сорбенте с ковалентно иммобилизованным белком A (MabSelect SuRe GE Healthcare, США). Электрофоретический анализ очищенного препарата подтвердил наличие

бендов, соответствующих по молекулярной массе тяжелой и легкой цепям антитела.

Для анализа иммунохимических свойств полученного антитела в качестве препарата сравнения использовали мышинное антитело 10H10 в эквивалентной концентрации. При анализе в ИФА на панели белков (TEF1, ZEF1, WEF1 и DEF1) для антител 10H10 и 10H10ch не наблюдали статистически достоверной разницы между сигналами.

При использовании цельновирионного антигена было показано, что значение обратного титра для TBEV мышинного антитела было выше, чем для химерного. Для антигена WNV значение титра для обоих антител было сходным. При использовании эквивалентных концентраций антител 10H10 и 10H10ch значения титра для химерного антитела к TBEV и WNV составило 1/218700 и 1/72900 соответственно. Для мышинного антитела 10H10 эти значения были 1/656100 и 1/2700 соответственно. Эти результаты выявили разницу в свойствах мышинного и химерного вариантов антител.

Взаимодействие антител также исследовали методом биослойной интерферометрии на приборе Octet K2 (ForteBio, Sartorius). Антигены поочередно иммобилизовали на поверхности биосенсора NTA (набор биосенсоров Ni-NTA), а антитела использовались в качестве аналита. Аффинность образования комплексов антигенов с антителом рассчитывалась как отношение K_D и K_A . Результаты представлены на рисунке 9.

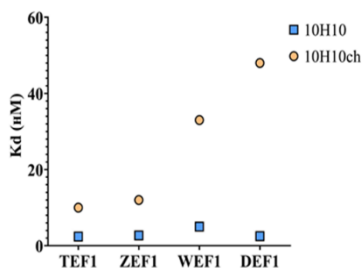


Рисунок 9. Схематическое представление распределения констант диссоциации антител 10H10 и 10H10ch.

Анализ полученных результатов показал, что K_d комплексов МКА 10H10 с белками TEF1, ZEF1, DEF1 и WEF1 составили 1,94 нМ, 3,93 нМ, 2,91 нМ и 5 нМ соответственно, а в случае химерного антитела 10H10ch аналогичные значения составили 10 нМ, 12 нМ, 48 нМ и 33 нМ соответственно. Таким образом, сконструированное антитело 10H10ch обладает наномолярной аффинностью, однако при этом, по этому показателю оно несколько уступает мышинному антителу 10H10. В тоже время его характеристики делают возможным разработку на его основе средств адресной доставки противовирусных веществ, активных в отношении ортофлавириусов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ежегодное число зарегистрированных случаев ортофлавириусных инфекций среди людей находится на высоком уровне. Одним из подходов

специфической терапии ортофлавивирусных инфекций может быть адресная доставка противовирусных препаратов при помощи антител, в том числе химерных. Создание химерных антител требует всестороннего изучения как донорного антитела, так и полученных вариантов.

Для локализации эпитопа антитела 10H10 были получены рекомбинантные белки, включающие фрагменты белка E и белка NS1 TBEV, а также фрагменты E белка ZIKV, DENV и WNV. При помощи иммунохимических методов было показано, что антитело 10H10 взаимодействует с поверхностным белком четырех ортофлавивирусов, включающих регион петли слияния.

На следующем этапе в работе на основе результатов секвенирования были получены первичные структуры переменных доменов антитела 10H10, и на их основе была построена третичная структура комплекса VH-VL. С использованием полученной 3D-модели переменных доменов антитела и модели оболочечного белка TBEV и ZIKV построена модель их комплекса, определено наиболее энергетически выгодное взаимное расположение.

Для картирования эпитопа антитела 10H10 использовали метод фагового дисплея. Для подтверждения связывания отобранных пептидов с антителом 10H10 использовали рекомбинантные бактериофаги системы p88 и p3. Были выявлены аминокислотные мотивы DRGWGN и GLFGK, отвечающие за связывание фаготопов. На основе отобранных фаготопов с использованием теоретических подходов построена модель комплекса пептидов с антителом.

На основе переменных доменов антитела 10H10 был спроектирован и получен интеграционный вектор pVEAL3-10H10ch, обеспечивающий, стабильную экспрессию химерного антитела 10H10ch в клетках CHO k1. Иммунохимическая оценка констант взаимодействия антител 10H10ch с панелью нативных и рекомбинантных антигенов ортофлавивирусов при помощи иммуноферментного анализа и биослойной интерферометрии показала, что Kd химерного антитела находится в наномолярном диапазоне и сравнима с исходным мышинным моноклональным антителом 10H10.

ВЫВОДЫ

1. Получена панель из семи рекомбинантных антигенов ортофлавивирусов TBEV, ZIKV, WNV и DENV. Использование панели рекомбинантных белков позволило уточнить локализацию эпитопа мышинного моноклонального антитела 10H10, который расположен в регионе петли слияния 98-DRGWGNHCGLFGK-110.

2. Определена нуклеотидная и соответствующая ей аминокислотная последовательность переменных доменов тяжелой и легкой цепи антитела 10H10, которые задепонированы в GenBank под номерами OK483332 и OL448869.

3. Анализ теоретической трехмерной модели комплекса переменных доменов тяжелой и легкой цепи антитела 10H10 с поверхностным белком TBEV показывает, что в их взаимодействие с высокой вероятностью вносят вклад водородные D_A98 и H_H38 ; G_A102 и Y_H40 ; H_A104 и D_L31 и π - π стекинговые связи - H_A104 и F_L114 , а для ZIKV водородные R_A99 и Y_H40 , R_A99 и Q_L116 , G_A104 и R_L52 , C_A105 и R_L52 и π - π стекинговые связи - F_A108 и Y_H40 , а также солевые мостики - D_A98 и K_L38 , K_A110 и D_H98 .

4. При помощи пептидного фагового дисплея отобраны фаготопы следующего репертуара GYAGWGNWSGLF, ALRYEGLFGAPW, SFDRGLWGLWSM и LPWGRWDALFGR, с консенсусным мотивом DRGWGNXXGLFGR, что частично совпадает с петлей слияния 98-DRGWGNHCGLFGK-110 поверхностного белка ортофлавириусов

5. Полученное химерное антитело 10H10ch взаимодействует с поверхностными фрагментами белков ортофлавириусов (TBEV, ZIKV, WNV и DENV) в иммунохимических анализах. Значение константы диссоциации для полученного антитела лежало в наномолярной области (10 – 48 нМ), а предельный обратный титр при использовании в качестве антигена лизатов TBEV составляет 218700, WNV – 72900.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК

1. Казачинская Е. И., Шаньшин Д. В., Иванова А. В. Лихорадка Зика: разработка средств диагностики, профилактики и лечения // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – № 2. – С. 6-13.

2. Шаньшин Д. В., Бакулина А. Ю., Казачинская Е. И., Пьянков С. А., Ильичев А. А., Щербаков Д. Н. Взаимодействие фрагментов оболочечного белка вируса Зика с антителами сывороток людей, переболевших флавивирусными инфекциями // Инфекция и иммунитет. – 2020. – Т. 10. – № 1. – С. 73-82.

3. Казачинская Е. И., Шаньшин Д. В., Щербаков Д. Н., Шестопалов А. М. Проблемные вопросы при разработке средств специфической профилактики лихорадки денге // Медицинская иммунология. – 2022. – Т. 24. – № 1. – С. 19-30.

4. Shanshin D. V., Borisevich S. S., Bondar A. A., Porozov Y. B., Rukhlova E. A., Protopopova E. V., Ushkalenko N. D., Loktev V. B., Chapoval A. I., Ilyichev A. A., Shcherbakov D. N. Can Modern Molecular Modeling Methods Help Find the Area of Potential Vulnerability of Flaviviruses? // International journal of molecular sciences. – 2022. – V. 23. – № 14. – P. 7721.

5. Шаньшин Д.В., Несмеянова В.С., Протопопова Е.В., Шелемба А.А., Локтев В.Б., Щербаков Д.Н. Получение и конструирование химерного гуманизированного широкореактивного антитела 10H10 к белку Е вируса клещевого энцефалита // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2024. – Т. 177. – №. 6. – С. 757-761.

6. **Shanshin D. V.** et al. Phage Display Revealed the Complex Structure of the Epitope of the Monoclonal Antibody 10H10 //International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Т. 25. – №. 19. – С. 10311.

7. Nesmeyanova, V.S.; **Shanshin, D.V.**; Murashkin, D.E.; Shcherbakov, D.N. Construction of an Integration Vector with a Chimeric Signal Peptide for the Expression of Monoclonal Antibodies in Mammalian Cells. Curr. Issues Mol. Biol. 2024, 46, 14464-14475.

Тезисы докладов на научных конференциях:

1. **Шаньшин Д. В.**, Бакулина А. Ю., Щербаков Д. Н. Получение продуцентов химерных белков вируса Зика и их характеристика // IV Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. – 2017. – С. 118.

2. **Шаньшин Д. В.**, Бакулина А. Ю., Щербаков Д. Н. Нитчатый бактериофаг M13 как платформа для создания панели антигенов // Инфекция и иммунитет. – 2017. – № 5. – С. 1031-1031.

3. Казачинская Е. И., Зайковская А. В., Никонорова Ю. В., **Шаньшин Д. В.**, Щербаков Д. Н. Исследование белковых маркеров, пригодных для иммунодиагностики вируса Зика // Инфекция и иммунитет. – 2017. – № 5. – С. 262-262.

4. Волкова Н. В., **Шаньшин Д. В.** Получение рекомбинантных минигеномов патогенных для человека флавивирусов // МНСК-2017: Биология. – 2017. – С. 116-116.

5. **Шаньшин Д. В.**, Иматдинов И. Р., Никанорова Ю. В., Волкова Н. В., Щербаков Д. Н. Получение продуцента рекомбинантного белка Е вируса Зика и его характеристика // III Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. – 2016. – С. 115-119.

6. Волкова Н. В., **Шаньшин Д. В.**, Щербаков Д. Н., Иматдинов И. Р. Создание искусственного иммуногена на основе структурных белков вируса Зика // III Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. – 2016. – С. 12-13.

7. **Шаньшин Д. В.**, Казачинская Е. И., Бакулина А. Ю., Гершони Д. М., Щербаков Д. Н. Мозаичные бактериофаги для выявления антител против вируса Зика // Биотехнология: состояние и перспективы развития. – 2018. – С. 152-154.

8. **Шаньшин Д. В.**, Борисевич С. С., Протопопова Е. В., Локтев В. Б., Щербаков Д. Н. Картирование эпитопа широкореактивного антитела 10n10 // IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков. – 2022. – С. 706-706.

Патент

Шаньшин Д.В., Несмеянова В.С., Щербаков Д.Н., Локтев В.Б., Протопопова Е.В., Ильичев А.А. Федеральное бюджетное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Плазмидная генетическая конструкция pVEAL3-10H10ch, штамм рекомбинантной клеточной линии CHO-k1-10H10ch и химерное антитело 10H10ch против вируса клещевого энцефалита, продуцируемое указанным штаммом клеточной линии CHO-k1-10H10ch. Патент РФ № RU 2800471 C1, C12N 15/00, C07K 16/10, C12N 1/00, C12N 15/63, № 2022126714, Заявл. 13.10.2022, Оpubл. 21.07.2023.