

В. В. Дубровская, Н. В. ТикуноваГосударственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
пос. Кольцово Новосибирской обл., 630559, Россия
E-mail: vita1@ngs.ru**ПОЛУЧЕНИЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА
К ОСНОВНОМУ ИММУНОДОМИНАНТНОМУ БЕЛКУ
ОРТОПОКСВИРУСОВ**

С помощью сывороток вакцинированных осповакциной доноров выявлен иммунодоминантный ортопоксвирусный белок с молекулярным весом около 35 кДа. Для получения одноцепочечных антител против этого белка сконструирована комбинаторная фаговая библиотека одноцепочечных антител человека на основе генов, кодирующих переменные домены тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, клонированных из лимфоцитов четырех доноров, вакцинированных вирусом осповакцины. Размер полученной библиотеки составил 3×10^7 независимых клонов. Полученная библиотека обогащена против вируса оспы коров; показано, что после двух раундов аффинного обогащения в ней преобладают антитела к тому же иммунодоминантному белку с молекулярным весом около 35 кДа. Из этой библиотеки отобрано 7 антител, связывающих вирус оспы коров, из которых 4 были специфичны к этому иммунодоминантному белку. Была измерена константа аффинности одного из этих антител, которая составила $3,13 \pm 0,52 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

Ключевые слова: ортопоксвирусы, одноцепочечные антитела, иммунодоминантный белок.

В последние годы происходит постоянный рост заболеваемости оспой обезьян, причем начиная с 2003 г. эта инфекция вышла за пределы Африканского континента [1]. Вирус оспы обезьян способен, наряду с вирусом натуральной оспы, вызывать у человека тяжелую генерализованную инфекцию. Оба этих вируса принадлежат к роду *Orthopoxvirus*, который включает вирусы, патогенные для млекопитающих, в частности, вирусы осповакцины и оспы коров, способные инициировать локальные повреждения у человека, а в случае нарушений иммунитета и генерализованное заболевание. Увеличение частоты заболеваемости оспой обезьян связано с отменой оспопрививания после глобальной ликвидации натуральной оспы. Возобновление классического оспопрививания связано с серьезными проблемами, поскольку неизменно увеличивается количество людей с врожденным или приобретенным иммунодефицитом, вакцинация которых могла бы привести к серьезным осложнениям и даже летальному исходу.

Для терапии и профилактики поствакцинальных осложнений можно использовать человеческий вакцинный иммуноглобу-

лин [2], но этот препарат дорог и малодоступен. К тому же применение препаратов, выделенных из человеческой крови, сопровождается биологическим риском. Альтернативой человеческому вакцинному иммуноглобулину могут быть моноклональные человеческие антитела, полученные путем селекции их переменных доменов из комбинаторных библиотек миниантител человека с последующим объединением их с константными доменами человеческих иммуноглобулинов [3]. Комбинаторные библиотеки миниантител представляют собой популяции бактериофагов, каждый из которых экспонирует на своей поверхности уникальный антиген-связывающий домен антитела: Fab фрагмент или одноцепочечное антитело, у которого переменные домены тяжелой и легкой цепи соединены между собой гибким пептидным линкером. При этом геном бактериофага содержит ген, кодирующий экспрессируемое антитело. Такая физическая сцепленность антитела и кодирующего его гена дает возможность быстрого отбора и анализа антигенспецифических молекул.

Библиотеки антител конструируют на основе V-генов иммуноглобулинов; в зави-

симости от способа создания их можно разделить на синтетические и натуральные. Синтетические библиотеки конструируются на основе нескольких *V*-генов иммуноглобулинов, рандомизированные гипервариабельные участки которых синтезируются *in vitro* [4]. Натуральные библиотеки основаны на генетическом материале пула лимфоцитов, гены которых реорганизованы *in vivo*, и, таким образом, они являются аналогом репертуара антител, циркулирующих в организме [5]. Если в качестве исходного материала используют последовательности *V*-генов иммуноглобулинов, полученные из лимфоцитов иммунизированных животных или людей, проявляющих иммунный ответ к определенному антигену, то такие библиотеки называются иммунными. В этом случае селекция и аффинное созревание последовательностей, кодирующих антитела, специфически связывающие целевой антиген, отчасти происходит уже *in vivo*, а сами библиотеки содержат антитела к иммунодоминантным антигенным детерминантам.

Вирус осповакцины является сильным иммуногеном и формирует у вакцинированных людей длительное состояние иммунитета. С использованием животных моделей идентифицированы различные иммунодоминантные белки вируса осповакцины [6]. Однако данные об иммунном ответе, возникающем у человека в результате вакцинации, ограничены.

Целью работы явилось определение иммунодоминантных белков ортопоксвирусов, отбор одноцепочечных антител человека к основным иммунодоминантным белкам ортопоксвирусов из комбинаторной иммунной библиотеки. Такие антитела могут быть полезны для ясного понимания механизмов протективного иммунитета, возникающего у человека в результате вакцинации, а также для создания терапевтических препаратов и более безопасных вакцин.

Материал и методы

В работе использовали: вирус оспы коров (штамм Гришак) и вирус осповакцины (штамм ЛИВП) из коллекции научного центра; бактериальные штаммы *E. coli* TG1 (*K12*, *D (lac-pro)*, *supE*, *thi*, *hsdD5 / F' traD36*, *proA+B+*, *lacIq*, *lacZDM15*), *E. coli*

HB2151 (*K12*, *ara*, *D (lac-pro)*, *thi / F' proA+B+*, *lacIq*, *lacZDM15*); бактериофаг M13K07.

Аффинное обогащение библиотеки специфическими клонами. Для первого и второго раунда вирус оспы коров сорбировали в лунки полистироловых планшетов в концентрации 100 мкг/мл. Антиген растворяли в фосфатно-солевом буферном растворе, pH 7,2. Затем места неспецифического связывания блокировали 0,2 % раствором Твин-20 в фосфатно-солевом буфере в течение часа, после чего вносили в лунки по 10^{12} к. о. е. фаговых одноцепочечных антител, инкубировали 1 час при 37 °С. Далее лунки планшета промывали 20 раз 0,1 % раствором Твин-20 в фосфатно-солевом буфере, 20 раз фосфатно-солевым буфером. Элюцию бактериофагов проводили раствором антигена той же концентрации, которую использовали при сорбции: в течение 15 мин при 37 °С. Полученными элюатами инфицировали клетки *E. coli* TG1, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, после чего суспензию центрифугировали при 3 000 g 10 мин и рассеивали на чашку Петри 24 × 24 см. Чашки инкубировали в термостате при 30 °С. На следующий день отдельные колонии инокулировали в среду 2×YT, содержащую 1 % глюкозу и 100 мкг/мл ампициллина, культивировали и выделяли фаговые антитела согласно методики [7].

Иммуноферментный анализ. В лунки полистироловых планшетов сорбировали вирус оспы коров, разведенный в фосфатно-солевом буфере до 5 мкг/мл. Затем участки неспецифического связывания насыщали 2 % раствором бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере при 37 °С 2 часа, после чего лунки промывали фосфатно-солевым буфером, инкубировали 1 час при 37 °С с выделенными ранее фаговыми антителами в 0,1 % растворе Твин-20 в фосфатно-солевом буфере. Далее снова промывали 0,1 % раствором Твин-20 в фосфатно-солевом буфере и фосфатно-солевым буфером. Связавшиеся бактериофаги выявляли специфическими к бактериофагу M13 мышинными моноклональными антителами («Progen», Германия) в разведении 1 : 6 000 в 0,1 % растворе Твин-20 в фосфатно-солевом буфере с последующим связыванием с антивидовым конъюгатом щелочной

фосфатазы («Sigma», США). После трехкратной промывки 0,1 % раствором Твин-20 в фосфатно-солевом буфере и AP-буфером (100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 100 мМ Tris-HCl, pH 9,5) в лунки добавляли паранитрофенилфосфат в буфере Tris-HCl, pH 7,2 («ICN», США).

Western-блот анализ. Белки вирусов осповакцины и оспы коров фракционировали электрофоретически в 15 % полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Millipore», США). Места неспецифического связывания на мембране насыщали 5 % раствором сухого молока в фосфатно-солевом буфере при 37 °С в течение 2-х часов. После этого мембрану промывали фосфатно-солевым буфером 3 раза по 3–5 мин и затем инкубировали с фаговыми антителами или с сывороткой крови доноров, разведенной до концентрации 1 010 бляшкообразующих единиц в мл или в отношении 1 : 200 в буфере 0,1 % растворе Твин-20 в фосфатно-солевом буфере соответственно, после чего трижды промывали 0,1 % раствором Твин-20 в фосфатно-солевом буфере и трижды фосфатно-солевым буфером. Иммунные комплексы выявляли специфическими антителами к бактериофагу M13 («Progen», Германия) в разведении 1 : 6 000 с последующим связыванием с антивидовым конъюгатом щелочной фосфатазы в разведении 1 : 4 000. В случае сывороток иммунные комплексы выявляли антивидовым конъюгатом щелочной фосфатазы в разведении 1 : 10 000. Окрашивание иммунных комплексов проводили, добавляя 0,0005 г 5-бromo-3-индолил фосфата и 0,001 г нитро-тетразолиевого голубого в 3 мл AP-буфера. Реакцию останавливали погружением нитроцеллюлозной мембраны в дистиллированную воду.

Выделение одноцепочечных антител в растворимой форме. Отдельные колонии засеивали в пробирки с 2 мл 2×YT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 0,1 % глюкозу. Культуру *E. coli* выращивали при постоянном перемешивании при 37 °С до OD₆₀₀ = 0,8, после чего проводили индукцию культуры 1 мМ изопропил-β-тиога-лактозидом и переносили в 25 мл среды 2×YT. Клетки инкубировали при постоянном перемешивании при 30 °С в течение

5 часов. Затем осаждали их центрифугированием, осадок ресуспендировали в 200 мкл STE-буфера (сахароза 20 %, 10 мМ Tris, pH 8,0, 1 мМ этилендиаминтетраацетат) и оставляли на 30 мин во льду. После этого, суспензию центрифугировали при 13 000 об/мин 30 мин при 4 °С. Полученный супернатант представлял собой периплазматическую фракцию клеток, которую и использовали для выделения собственно моноклональных растворимых антител, проводя очистку его с помощью набора «NI-NTA Qiagen Kit».

Результаты исследования и обсуждение

С целью определения иммунодоминантных белков ортопоксвирусов нами исследовано связывание антител сывороток вакцинированных доноров с белками вируса осповакцины и оспы коров с помощью Western-блот анализа. Антитела сывороток № 2–4 лучше всего выявляли белок вируса осповакцины и оспы коров массой около 35 кДа (рис. 1), кроме того сыворотки № 5 и 3 отчетливо выявляли белок, массой около 13–14 кДа. Кроме этих белков антитела сывороток связывались и с другими белками вируса осповакцины и оспы коров с молекулярными массами 27, 32, 39, 62 кДа, но более слабая интенсивность окрашивания этих белков с помощью антител сыворотки, по всей видимости, обусловлена тем, что в поликлональной популяции, антитела с такой специфичностью представлены в меньшем количестве. Следовательно, в большинстве исследованных сывороток вакцинированных доноров доминировали антитела против белка массой около 35 кДа, что согласуется с другими исследованиями [6].

Источником генетического материала для конструирования библиотеки были периферические лимфоциты крови четырех доноров, вакцинированных вирусом осповакцины. Двое из них были вакцинированы впервые (дорожка 2 и 3), а для двоих была проведена ревакцинация (дорожка 4 и 5 (см. рис. 1). Забор крови проводили у каждого донора в тот момент, когда титр антител против вируса осповакцины в сыворотке достигал плато значения. У ревакцинированных доноров это происходило через 2 недели, титр сывороток составлял 1 : 25 600,

Рис. 1. Иммуноблоттинг белков вируса осповакцины (А) и вируса оспы коров (В) с сыворотками вакцинированных доноров (2–5); исходной популяцией фаговых антител (6) и популяциями фаговых антител, полученных после первого (7) и второго (8) раунда аффинного обогащения библиотеки против вируса оспы коров; фаговыми антителами (10–16) и фагом-помощником М13К07 (9).

М – маркер молекулярных масс белков, 1 – белковые профили соответствующих вирусов

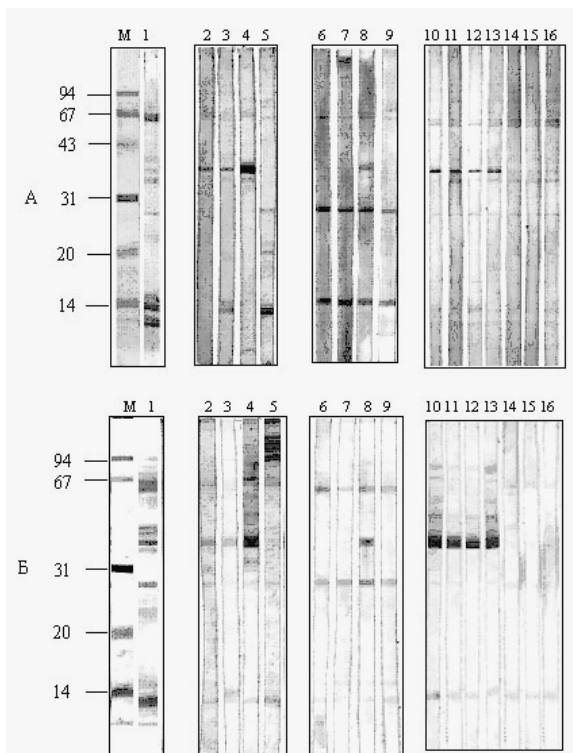
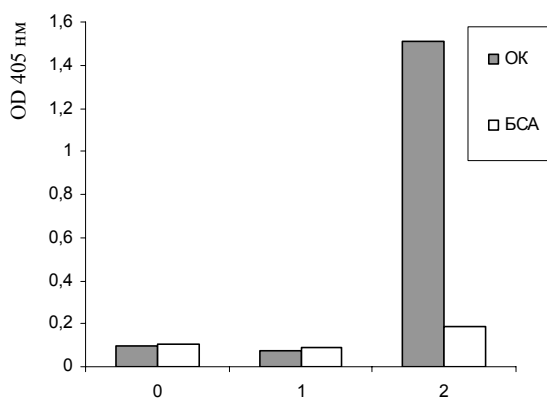


Рис. 2. Связывание популяций фаговых антител с вирусом оспы коров (ОК) и бычьим сывороточным альбумином (БСА) в ИФА.

0 – исходная фаговая популяция; 1, 2 – популяции фагов после соответствующих раундов селекции



а у впервые вакцинированных кровь отбирали недель позже, титр сывороток при этом составлял 1 : 60 00–80 000.

При конструировании библиотеки для синтеза последовательностей, кодирующих переменные домены иммуноглобулинов человека, использован набор праймеров, аналогичный используемому в работе Т. А. Батановой и соавт. [8]. Для повышения вероятности отбора доминирующих антител используемый набор праймеров ограничивал амплификацию переменных доменов тяжелых цепей в пользу семейств 1, 3 и 5, а в случае легких κ - и λ -цепей – в пользу семейств 1, 2 и 3, так как известно, что антитела, преобладающие в крови человека, чаще всего принадлежат этим семействам [4]. Кроме того, антитела этих семейств при экспрессии в одноцепочечной форме обладают максимальной термодинамической стабильностью [9].

Конструирование и амплификацию библиотеки, а также наработку и выделение фагмидных частиц проводили, как описано ранее [7; 8]. После проведения всех этапов конструирования получена комбинаторная иммунная библиотека одноцепочечных антител человека размером 3×10^7 независимых клонов. В качестве антигена для обогащения полученной библиотеки и отбора из нее антител был взят жизнеспособный вирус оспы коров, штамм Гришак. В настоящее время показано, что этот вирус наиболее близок к предшественнику рода ортопоксвирусов [10] и является патогенным для человека и для многих видов животных, с ним соседствующих.

Аффинное обогащение библиотеки проводили в ходе двух последовательных раундов аффинной селекции (рис. 2). Полученные после каждого раунда аффинной селекции поликлональные популяции фаго-

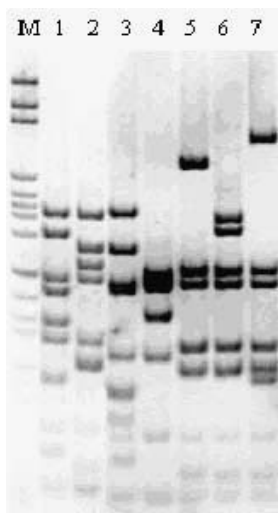


Рис. 3. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ДНК клонов, отобранных против вируса оспы коров, с помощью эндонуклеазы рестрикции *HaeIII*.

М – *pBR327-HaeIII*

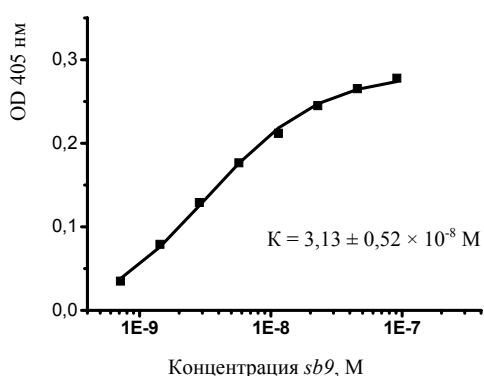


Рис. 4. Иммуноферментный анализ связывания одноцепочечного антитела *sb9* с вирусом оспы коров

вых антител, а также исходная библиотека антител были протестированы в иммуноферментном анализе по способности связываться с вирусом оспы коров.

Результаты тестирования показали значительное превышение сигнала при связывании антигена фаговой популяцией, полученной уже после второго раунда аффинной селекции, что свидетельствует об обогащении библиотеки антителами против вируса оспы коров. Способность тех же фаговых популяций связывать различные белки вирусов осповакцины и оспы коров была оценена с помощью Western-блот анализа (дорожки 6–8) (см. рис. 1). Показано, что после второго раунда аффинного обогащения против вируса оспы коров в библиотеке одноцепочечных антител человека доминируют антитела, связывающие белок с массой около 35 кДа. Вероятно, антитела, связывающие другие белки оспы коров, менее представлены количественно. Они, по всей видимости, обладают низкой аффинностью, отсеиваясь в ходе раундов аффинной селекции.

Следующей задачей работы был отбор из обогащенной библиотеки одноцепочечных

антител человека, специфических к иммунодоминантному белку, массой около 35 кДа. В результате скрининга 42-х клонов с помощью твердофазного ИФА, получено 8 клонов, способных продуцировать антитела, связывающиеся с вирусом оспы коров. Разнообразие отобранных антител было исследовано с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов их генов с использованием эндонуклеазы рестрикции *HaeIII*. Всего было выявлено 7 различающихся рестрикционных профилей (рис. 3).

Специфичность отобранных антител была подтверждена с помощью Western-блот анализа белков вируса оспы коров и вируса осповакцины. Оказалось, что 4 из 7 антител (*d2*, *b9*, *e8* и *e7*) связывали ортопоксвирусный белок массой около 35 кДа (дорожки 10–13 соответственно) (см. рис. 1). Остальные, по-видимому, связывали конформационные эпитопы вирусных белков.

С целью оценки аффинности отобранных антител, одно из них, антитело *b9*, было переведено в растворимую форму. Для определения константы аффинности использо-

вали метод ИФА. Для этого 3 мкг/мл вируса оспы коров сорбировали в лунки полистироловых планшетов и после блокировки мест неспецифического связывания инкубировали с последовательными разведениями очищенного *sb9*, начиная с 3,2 мкг/мл с шагом 1 : 2. Связавшиеся молекулы антитела выявляли анти-*c-тус* антителами, а затем конъюгатом щелочной фосфатазы с антивидовыми антителами. Визуализацию иммунных комплексов проводили, добавляя паранитрофенилфосфат, данные о взаимодействии антитела с антигеном, измеряли в оптических единицах через 20 мин (рис. 4).

Величину константы связывания растворимого миниантитела *sb9* рассчитывали по специальной формуле; в результате она составила $3,13 \pm 0,52 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

Заключение

В ходе исследования показано, что одним из иммунодоминантных белков ортопоксвирусов, против которого нарабатываются антитела после вакцинации вирусом осповакцины, является белок молекулярной массой около 35 кДа. Впервые получена комбинаторная иммунная библиотека одноцепочечных антител человека против ортопоксвирусов и показано, что после аффинного обогащения против вируса оспы коров в ней преимущественно содержатся антитела против белка вирусов массой около 35 кДа. Это отчасти отражает репертуар доминирующих антител в организме человека после вакцинации. Получены антитела, связывающие ортопоксвирусный белок 35 кДа, рассчитана константа аффинности одного из антител, специфичного к белку данной массы, что свидетельствует о том, что данное антитело является высокоаффинным и при наличии у него противовирусных свойств на его основе может быть сконструировано полноразмерное рекомбинантное антитело человека, которое может использоваться для профилактики и лечения ортопоксвирусных инфекций.

V. V. Dubrovskaya, N. V. Tikunova

Development of single chain human antibodies specific to the immunodominant protein of orthopoxviruses

The immunodominant orthopoxvirus protein with molecular weight about 35 kDa was identified using the sera of vaccinia virus immune donors. In order to select single chain antibodies against the protein, a combinatorial phage display library of human single-chain antibody fragments was generated using variable domains of heavy and light genes cloned from the lymphocytes of four vaccinia virus vaccinated donors.

Keywords: orthopoxviruses, single chain antibodies, immunodominant protein.

Список литературы

1. *Reemergence of monkeypox: prevalence, diagnostics, and countermeasures* / A. Nalca, A. W. Rimoin, S. Bavari et al. // *Clin. Infect. Dis.* 2005. Vol. 41. P. 1765–1771.
2. *Hopkins R. J., Lane J. M.* Clinical efficacy of intramuscular vaccinia immune globulin: a literature review // *Clin. Infect. Dis.* 2004. Vol. 39. P. 819–826.
3. *Brekke O. H., Loset G. A.* New technologies in therapeutic antibody development // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2003. Vol. 3. P. 544–550.
4. *Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides* / A. Knappik, L. Ge, A. Honegger et al. // *J. Mol. Biol.* 2000. Vol. 296. P. 57–86.
5. *Willats W. G.* Phage display: practicalities and prospects // *Plant Mol. Biol.* 2002. Vol. 50. P. 837–854.
6. *Vaccinia virus H3L envelope protein is a major target of neutralizing antibodies in humans and elicits protection against lethal challenge in mice* / D. H. Davies, M. M. McCausland, C. Valdez et al. // *J. Virol.* 2005. Vol. 79. P. 11724–11733.
7. *Мини-антитела человека против ортопоксвирусов* / В. В. Морозова, Н. В. Тикунова, Т. А. Батанова и др. // *Вестн. РАМН.* 2004. № 8. С. 22–27.
8. *Создание и характеристика наивной комбинаторной библиотеки одноцепочечных антител человека* / Т. А. Батанова, А. Б. Улитин, В. В. Морозова и др. // *Мол. ген. вирусол. и микробиол.* 2006. № 3. С. 35–41.
9. *Biophysical properties of human antibody variable domains* / S. Ewert, T. Huber, A. Honegger et al. // *J. Mol. Biol.* 2003. Vol. 325. P. 531–553.
10. *Variola and camelpox virus-specific sequences are part of a single large open reading frame identified in two German cowpox virus strains* // H. Meyer, A. Totmenin, E. Gavrilova et al. // *Virus Res.* 2005. Vol. 108. P. 39–43.

Материал принят в печать 02.10.2006