

## НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

© 2009 г. Л. Н. Леванов\*\*\*, Л. Э. Матвеев\*\*, Т. Э. Юн\*\*\*, Е. П. Гончарова\*, Л. Р. Лебедев\*, А. Н. Швалов\*, А. Б. Рыжиков\*, И. К. Байков\*\*\*, В. А. Матвеева\*\*, В. А. Рихтер\*\*, Н. В. Тикунова\*\*\*\*

\*ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”, 630559, Новосибирская обл., пос. Кольцово;

\*\*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Поступила в редакцию 25.11.2008 г. Принята к печати 29.12.2008 г.

На основе κДНК-фрагментов генов, кодирующих вариабельные домены тяжелой и легкой цепей моноклонального антитела МКА13D6 против гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита (КЭ), сконструирована рекомбинантная плазмидная ДНК рSC13D6. Эта плазида обеспечивала экспрессию одноцепочечного антитела sc13D6 против вируса КЭ в клетках *Escherichia coli*. Продуцируемое антитело способно связывать вирус КЭ, штамм 205, и рекомбинантный белок Е вируса КЭ. Константа аффинности очищенного sc13D6 составила  $(3.0 \pm 0.2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  для равновесия в растворе, а в случае образования комплексов антиген–антитело на поверхности –  $(2.8 \pm 0.3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ . Полученное одноцепочечное антитело способно ингибировать инфекционность вируса КЭ на монослое эукариотических клеток. Расчетная величина  $\text{IC}_{50}$  для sc13D6 составила 16.7 мкг/мл.

*Ключевые слова:* одноцепочечные антитела; аффинность; вирус клещевого энцефалита.

### ВВЕДЕНИЕ

Вирус клещевого энцефалита, представитель семейства *Flaviviridae*, является высокопатогенным инфекционным агентом, способным вызывать серьезные поражения нервной системы. Современная эпидемическая ситуация в отношении КЭ характеризуется значительным ростом заболеваемости [1, 2]. Эта закономерность характерна не только для России, где регистрируется большая часть случаев заболеваний, но и для многих европейских стран. В РФ за последнюю четверть XX в. заболеваемость КЭ возросла в девять раз и достигла 11000 случаев в год [1]. В настоящее время единственным специфическим средством лечения этого заболевания является гамма-глобулин против вируса КЭ, получаемый из крови иммунизированных людей. Высокая стоимость данного препарата и возможный риск при его применении делают необходимым поиск альтернативных терапевтических средств. В качестве альтернативы гамма-глобулину могли бы использоваться моноклональные антитела человека, однако,

к настоящему времени МКА человека, специфически направленные к вирусу КЭ, отсутствуют.

В последние годы опубликован ряд работ, посвященных созданию искусственных антител, которые, как полагают, будут более дешевыми, безопасными и более эффективными, чем иммуноглобулины, выделенные из крови иммунизированных животных и людей [3, 4]. Большой интерес представляют одноцепочечные антитела, которые состоят из вариабельных доменов тяжелой (Vh) и легкой (Vl) цепей иммуноглобулинов, объединенных гибким пептидным линкером. Небольшие размеры одноцепочечных антител облегчают проникновение их в ткани и выведение из организма [5]. Кроме того, отсутствие константных доменов приводит к значительному снижению иммуногенности этих молекул, что позволяет рассчитывать на их использование в медицинской практике, в частности, для борьбы с вирусными заболеваниями.

Известны способы получения одноцепочечных антител к разнообразным антигенам, в том числе к рецепторам раковых клеток [6], ферритину человека [7], риновирусу человека [8]. Известен способ получения одноцепочечных антител к вирусу шотландского энцефаломиелита, принадлежащего к семейству *Flaviviridae*, которые обладают вируснейтрализующей активностью [9]. Ранее нами были получены мономерные и димерные одноцепочечные антитела против вируса КЭ, однако, наличие у

Сокращения: МКА – моноклональные антитела; КЭ – клещевой энцефалит; sc – одноцепочечные антитела;  $\text{IC}_{50}$  – концентрация 50%-ного ингибирования вирусной инфекционности; Vh и Vl – вариабельные домены тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция; CDRs – гипервариабельные районы; IPTG – изопропил-β-D-тиогаляктозид.

\* Автор для связи (тел.: (383) 336-58-95; эл. почта: tikunova@vector.nsc.ru).

Vh-цепи	
	CDR-1
13D6	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFIDYWIHWVKQRPGGLEWIG
4.2	.....P..V.....T..V.G.....T.....
10C2	E..K..EE.VP..V.....L...S.....TENT.....SH.KS..Y..
E6B	VEL.ESG.GL.VQ..E.M.L.....F..S.A.MD...L.S.EK...VA
	CDR-2
13D6	YINPTTDYTYNQTFKDK--ATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC
4.2	E..Y.GSGT....EK.....--.....N.....F.
10C2	G...DNGG.S...K..G.--...V.....E..R.....
E6B	E..RSKSNNHATSYAESVEGRF..ISR.D.SV.L.MNN.RA..TGI.....
	CDR-3
13D6	AR-EGF---ALDYWGQRTTVTVSS
4.2	..G.DEYYI.....G.....
10C2	..W.I.TA--T.A...G.L.....
E6B	T..YY.YLWYF.VL..G.....
VI-цепи	
	CDR-1
13D6	DIELTQSPN-SLSTSVGEGVSI TCKASQDVSTTVA----WYQQKPGQSP
4.2	.....A...A...T.T...R..GNIHNYL.----...Q.K..
10C2	.....A-LM.A.P..K.TM..S..SS..-YMF----...RS..
E6B	.....PP..AV.L.Q.AT.S.R..KSLDSYGNSFLH.....L..P.
	CDR-2
13D6	KLLIYSASYRYTGVDPDRFTGSGSGTDFTFITRSVQAEDFGSYYYCQHYS
4.2	Q..V.K.QTLAD...S..S.....QYSLK.N.L.P.....HFW.
10C2	.SW..LT.NLAS...A..S.....SYSL..S.ME...AAT.....WS.
E6B	.....L..NLES.L.A..S...R...L..DVPE.D.AAT.....NND
	CDR-3
13D6	TPP-TFGGGTKLEIKRA
4.2	..W.....
10C2	-L-T..A.....
E6B	D.--...S.....

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей вариабельных доменов тяжелых (Vh) и легких (VI) цепей моноклональных антител, 13D6, 4.2, 10C2 и E6B. В виде точек изображены идентичные аминокислотные остатки. Прочерки – делеции. CDR1–CDR3 – гипервариабельные районы (*Complementarity Determining Regions*).

этих антител вируснейтрализующих свойств в отношении вируса КЭ выявлено не было [10–12].

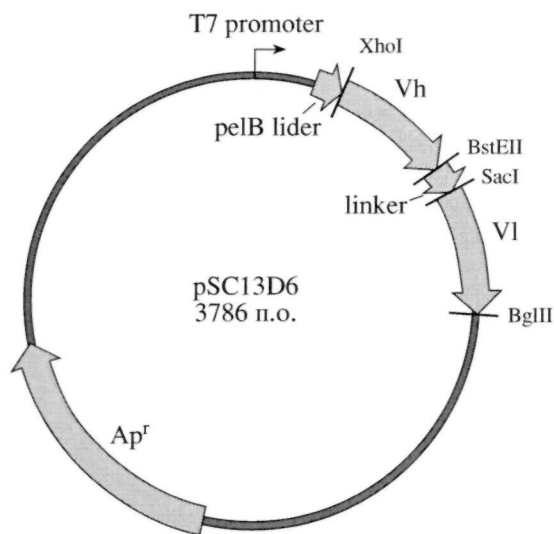
Цель данной работы заключалась в получении одноцепочечного антитела против вируса КЭ, обладающего вируснейтрализующими свойствами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

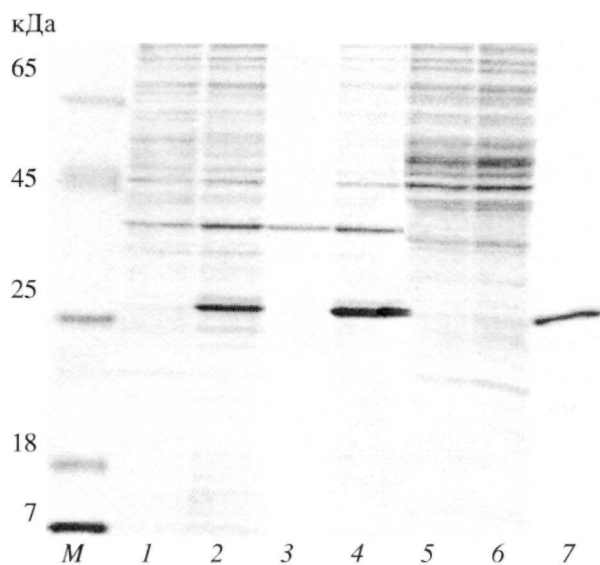
Для конструирования одноцепочечного антитела к вирусу КЭ в качестве прототипа было использовано МКА 13D6, продуцируемое мышьяной гибридомой. Выбор этой гибридомы был обусловлен тем, что МКА 13D6 способно защищать модельных животных от вирусной инфекции в реакции биологической нейтрализации. Кроме того, это антитело, взаимодействующее с поверхностным гликопротеином Е вируса КЭ, способно блокировать гемагглютинирующую активность вируса и ингибировать его ин-

фекционность в культуре эукариотических клеток [13].

На первом этапе работы из клеток гибридомы 13D6 выделили суммарную РНК. Синтез кДНК и амплификацию генов, кодирующих вариабельные домены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина мыши, проводили методом ОТ-ПЦР. После определения нуклеотидных последовательностей ПЦР-фрагментов, кодирующих Vh- и VI-цепи МКА 13D6, было показано, что Vh-сегмент принадлежит к семейству VHJ558.45 тяжелых цепей антител мыши, а VI-сегмент принадлежит к семейству к-цепей. Принадлежность сегментов к семействам определяли с помощью базы данных IgbLAST. На рис. 1 приведены аминокислотные последовательности вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей антитела 13D6 в сравнении с Vh- и VI-цепями МКА 4.2, 10C2 и E6B [9–12]. Известно [9], что МКА 4.2 способно ней-



**Рис. 2.** Схема строения рекомбинантной плазмиды рSC13D6. Указаны сайты эндонуклеаз рестрикции. T7 – поздний промотор фага T7; pelB – фрагмент ДНК, кодирующий лидерный пептид; Vh и VI – варибельные участки генов, кодирующих тяжелую и легкую цепи рекомбинантного антитела; linker (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> – фрагмент ДНК, кодирующий линкерный пептид; Ap<sup>r</sup> – ген устойчивости к ампициллину.



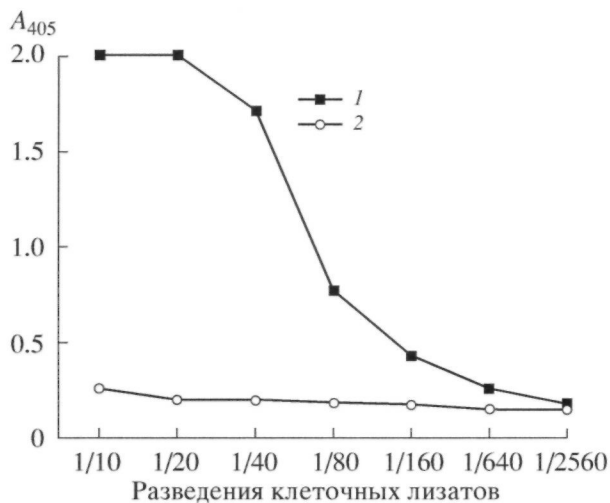
**Рис. 3.** Электрофоретическаяграмма в 12% SDS-ПААГ лизатов клеток, периплазматических и цитоплазматических фракций, а также очищенного одноцепочечного антитела. Дорожки: лизаты клеток *E. coli* BL21(DE3)/pGEM1 (1), *E. coli* BL21(DE3)/pSC13D6 (2); периплазматические фракции клеток *E. coli* BL21(DE3)/pGEM1 (3), *E. coli* BL21(DE3)/pSC13D6 (4); цитоплазматические фракции клеток *E. coli* BL21(DE3)/pGEM1 (5), *E. coli* BL21(DE3)/pSC13D6 (6); очищенное sc13D6 (7); M – стандарты молекулярных масс.

трализовать вирус шотландского энцефалита овец, который по современной классификации относится к роду Flavivirus. Подобные свойства в отношении вируса КЭ для антител 10С2 и Е6В не были показаны. Из данного аминокислотного сравнения видно, что Vh- и VI-гены, кодирующие варибельные домены антител 13D6 и 4.2, имеют схожие мотивы. Подобная схожесть варибельных фрагментов позволила предположить, что области связывания данных антител с гликопротеином Е могут перекрываться. Тем более известно, что оба антитела связываются с одним и тем же доменом гликопротеина Е вируса КЭ [9, 13].

На следующем этапе ДНК-фрагменты, кодирующие Vh- и VI-домены МКА 13D6, объединяли с помощью олигонуклеотида, кодирующего линкерный пептид (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>. Полученный ген одноцепочечного антитела встраивали в плазмиду рGEM1 под транскрипционный контроль позднего промотора бактериофага T7. К 5'-концу гена, кодирующего одноцепочечное антитело 13D6 (sc13D6), был присоединен фрагмент ДНК, кодирующий лидерный пептид пектатлиазы В (pelB) *Erwinia carotovora*, полученный на основе плазмиды рЕТ (rF11) [7] с использованием ПЦР. Известно, что лидерные пептиды эффективно секретируемых прокариотических белков, таких, как pelB, направляя секрецию в периплазматическое пространство, способствуют правильной упаковке молекул одноцепочечных антител. Считается, что секреция белка в периплазму бактерий имитирует его транспорт через эндоплазматический ретикулум в эукариотических клетках [14]. В результате была получена рекомбинантная плазмида рSC13D6 (рис. 2). Правильность встраивания ДНК-фрагментов подтверждали секвенированием.

Сконструированной плазмидой рSC13D6 трансформировали клетки *E. coli* BL21(DE3), содержащие в бактериальной хромосоме ген РНК-полимеразы фага T7 под контролем индуцибельного промотора lacUV5. При добавлении в культуральную среду индуктора lac-оперона IPTG в этом штамме синтезируется РНК-полимераза фага T7, обеспечивающая высокоэффективную транскрипцию со специфических промоторов. Клетки *E. coli* BL21(DE3)/pSC13D6 индуцировали IPTG в среднелогарифмической стадии роста и культивировали в течение ночи. Электрофоретический анализ лизатов клеток *E. coli* BL21(DE3)/pSC13D6 показал наличие в индуцированной культуре дополнительного в сравнении с лизатом BL21(DE3)/pGEM1 (рис. 3, дорожка 1) белка с молекулярной массой около 26 кДа (рис. 3, дорожка 2), что соответствует расчетной молекулярной массе одноцепочечного антитела.

Способность полученного одноцепочечного антитела связывать вирус КЭ была подтверждена анализом взаимодействия клеточных лизатов, содержащих одноцепочечное антитело, с вирусом КЭ, сорбированным на поверхность иммунологическо-



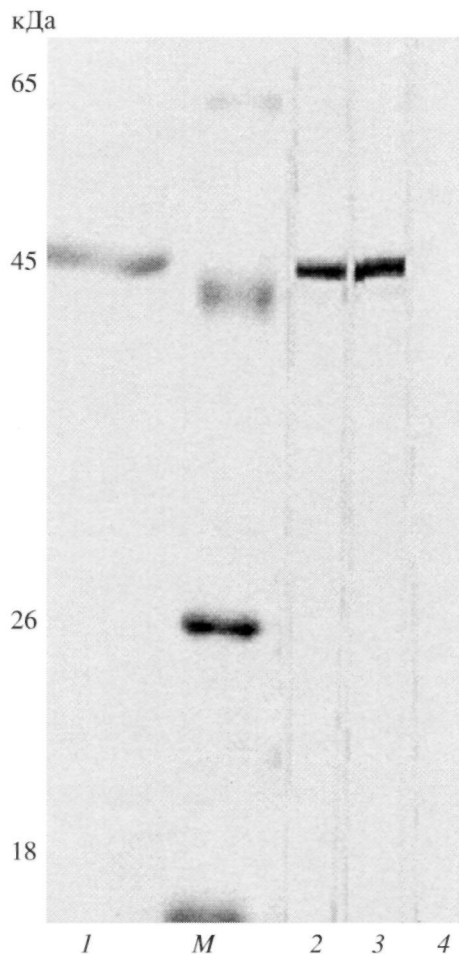
**Рис. 4.** Иммуноферментный анализ взаимодействия клеточных лизатов BL21(DE3)/pSC13D6 (1), содержащих sc13D6, и BL21(DE3)/pGEM1 (2) с инактивированным вирусом КЭ, штамм 205. Клеточные лизаты нанесены в последовательных разведениях; проявление антивидовым конъюгатом щелочной фосфатазы в разведении 1/1000.

го пластика (метод ИФА). Результаты показали, что значение оптического поглощения при связывании с вирусом КЭ одноцепочечного антитела достоверно превышает таковое в контроле (рис. 4), что доказывает способность sc13D6 эффективно связываться с вирусом КЭ.

Исследование внутриклеточной локализации sc13D6 показало, что одноцепочечное антитело секретирувалось в периплазматическое пространство (рис. 3, дорожка 4). Полученные нами ранее мономерные и димерные одноцепочечные антитела против вируса КЭ [10, 11] локализовались преимущественно в цитоплазме. Считается, что секреция целевых белков в периплазму значительно облегчает процесс их очистки, так как периплазматические фракции содержат значительно меньше балластных белков, чем цитоплазматические. Кроме того, целевые периплазматические белки, как правило, являются растворимыми и биологически активными.

Выделение sc13D6 из периплазмы проводили методом гель-фильтрации. Результаты представлены на рис. 3 (дорожка 7). Анализ геля с помощью программы “Gel-Pro” показал, что уровень очистки составил приблизительно 70%.

Специфичность очищенного sc13D6 подтверждали с помощью иммуноблот-анализа (рис. 5). Было показано, что одноцепочечное антитело выявляло рекомбинантный белок Е вируса КЭ [15]. В качестве положительного контроля использовали исходное МКА 13D6, в качестве отрицательного – нормальную неиммунную мышиную сыворотку (рис. 5).



**Рис. 5.** Электрофореграмма в 12% SDS-ПААГ рекомбинантного белка Е вируса КЭ (1) и иммуноблот-анализ этого белка с использованием очищенного sc13D6 (2), МКА 13D6 (3), а также нормальной неиммунной мышинной сыворотки (4); М – стандарты молекулярных масс.

На следующем этапе была определена константа аффинности полученного антитела для двух типов равновесия: образования комплексов антиген–антитело в растворе, а также на поверхности полистирола. В первом случае константа аффинности характеризует взаимодействие с антигеном, циркулирующим в организме. Вторая система имитирует процесс связывания антитела с антигеном, экспонированным на поверхности клеточной мембраны. Вследствие возможных конформационных изменений, а также некоторых поверхностных эффектов, константа гетерофазного равновесия может существенно отличаться от константы равновесия в растворе.

Для определения константы аффинности sc13D6 использовали методы ИФА, поскольку в этом случае не требуется высокая степень очистки исследуемых антител [16]. Константу равновесия в растворе определяли согласно методике, описанной ранее [17], с незначительными модификациями. В частно-

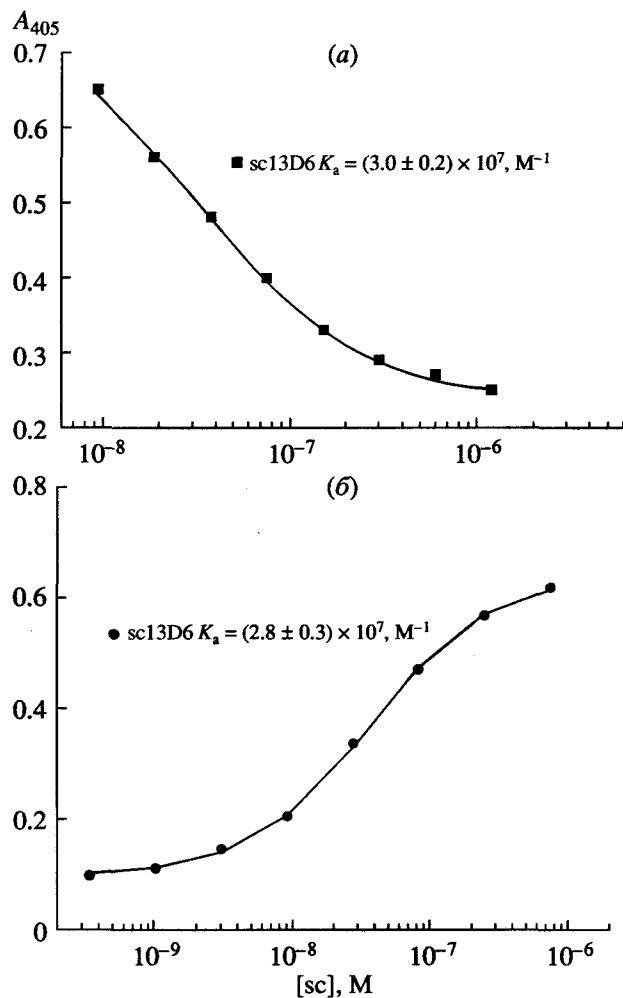


Рис. 6. Иммуноферментный анализ взаимодействия очищенного sc13D6 с рекомбинантным белком E вируса КЭ в растворе (а) и на поверхности (б); проявление антивидовым конъюгатом щелочной фосфатазы в разведении 1/1000.

сти, для вычисления константы диссоциации проводили нелинейную регрессию результатов эксперимента с использованием следующей зависимости:

$$A_{405}(B_0) = N \left( A_0 - B_0 - K_d + \sqrt{(A_0 + B_0 + K_d)^2 - 4A_0B_0} \right),$$

где  $A_{405}$  – оптическое поглощение раствора в лунке планшета,  $A_0$  – суммарная концентрация антитела в растворе (на стадии первоначальной инкубации),  $B_0$  – суммарная концентрация белка E,  $K_d$  – константа равновесия диссоциации комплекса антиген–антитело в растворе,  $N$  – нормировочный множитель, который определяется параметрами эксперимента и не зависит от концентрации антител. Регрессию осуществляли с использованием математического пакета Origin® 7.0. График зависимости значения поглощения раствора от концентрации антитела

приведен на рис. 6а.  $K_a$  для sc13D6 составила  $(3.0 \pm 0.2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ .

В случае связывания антитела с антигеном, сорбированным на поверхности, константу равновесия определяли согласно методике [18]. Для регрессии экспериментальных данных использовали следующую зависимость оптического поглощения раствора от концентрации антитела:

$$A_{405}(A_0) = N \left( A_0 + \frac{b_0}{V} + K_d^* - \sqrt{\left( A_0 + \frac{b_0}{V} + K_d^* \right)^2 - 4A_0 \frac{b_0}{V}} \right),$$

где  $A_{405}$  – оптическое поглощение раствора в лунке планшета,  $A_0$  – суммарная концентрация антитела в растворе,  $b_0$  – общее количество белка E, сорбированного на поверхности,  $K_d^*$  – константа равновесия диссоциации комплекса антиген–антитело на поверхности,  $V$  – объем раствора в лунке,  $N$  – нормировочный множитель. Регрессию осуществляли с использованием математического пакета Origin® 7.0. График зависимости значения поглощения раствора от концентрации антитела приведен на рис. 6б.  $K_a$  для sc13D6 составила  $(2.8 \pm 0.3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ .

Полученные значения констант свидетельствуют о том, что аффинность sc13D6 остается приблизительно одинаковой, находится ли антиген на поверхности или в растворе. Видимо, конформация рекомбинантного белка E в этих экспериментах не претерпевала существенных изменений. Константа аффинности исходного МКА 13D6, измеренная с помощью методов ИФА, составляет  $4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  [13]. Такая незначительная разница в константах между одноцепочечным антителом, содержащим один центр связывания, и молекулой иммуноглобулина G, обладающей двумя центрами связывания, видимо, обусловлена тем, что во втором случае преобладает односайтовое взаимодействие с молекулой антигена. Подобные результаты описаны в литературе рядом авторов и связаны они в первую очередь с природой молекулы иммуноглобулина. Показано, что способность антитела связываться с антигеном двумя центрами связывания зависит от гибкости его шарнирного участка, который, прежде всего, определяется изотипом антитела. Кроме того, немаловажное значение при связывании имеет расстояние между эпитопами на поверхности молекулы антигена [19].

Для оценки вируснейтрализующей способности sc13D6 его тестировали в реакции ингибирования фокусообразования вирусом КЭ на монослое перививаемых линий клеток СПЭВ (почки эмбриона свиньи). Результаты экспериментов, представленные на рис. 7, подтверждают способность очищенного одноцепочечного антитела ингибировать инфекционность вируса КЭ на монослое эукариотических клеток. В качестве положительного контроля

использовали гипериммунную сыворотку мыши, в качестве отрицательного – одноцепочечное антитело sc10C2, не обладающее нейтрализующими свойствами в отношении вируса КЭ. Расчетная величина  $IC_{50}$  для одноцепочечного антитела sc13D6 составила 16.7 мкг/мл.

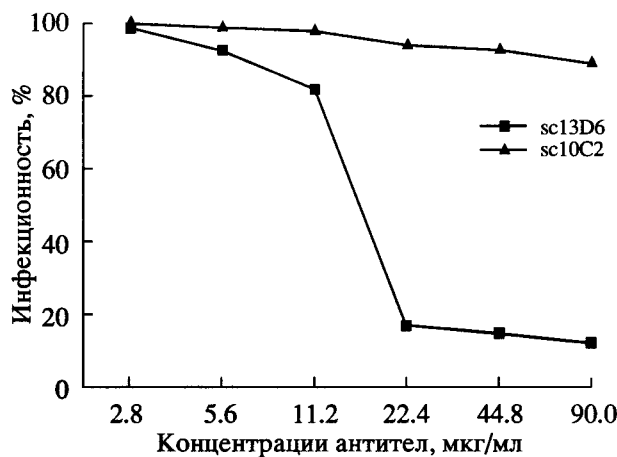
Таким образом, на основе генетического материала гибридомы 13D6, продуцирующей МКА против вируса КЭ, сконструирована рекомбинантная плазмидная ДНК pSC13D6, обеспечивающая экспрессию одноцепочечного антитела в растворимой форме в клетках *E. coli* BL21(DE3). Полученное антитело в составе клеточных лизатов способно эффективно связываться с вирусом КЭ, штамм 205. После хроматографической очистки sc13D6 была измерена константа аффинности этого антитела, которая составила  $(3.0 \pm 0.2) \times 10^7 M^{-1}$  для равновесия в растворе, а в случае образования комплексов антиген-антитело на поверхности –  $(2.8 \pm 0.3) \times 10^7 M^{-1}$ . Показано, что полученное одноцепочечное антитело способно ингибировать инфекционность вируса КЭ на монослое эукариотических клеток. Расчетная величина  $IC_{50}$  для sc13D6 составила 16.7 мкг/мл. Данные результаты позволяют надеяться на то, что на основе полученного одноцепочечного антитела могут быть созданы препараты для профилактики и терапии клещевого энцефалита. В этой связи перспективным выглядит направление по созданию на основе генов sc13D6 рекомбинантных полноразмерных молекул иммуноглобулинов (химерных и гуманизированных), обладающих меньшей иммуногенностью по сравнению с мышьяными МКА и способных осуществлять эффекторные функции за счет присоединенных константных доменов IgG человека.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали вирус клещевого энцефалита (штамм 205) (из коллекции микроорганизмов ФГУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора) и рекомбинантный белок E BKЭ [15]; эндонуклеазы рестрикции, *Taq*-полимеразу, *Pfu*-полимеразу, ДНК-лигазу фага T4 (Сибэнзим, Россия); бактериальные штаммы *E. coli* DH5 $\alpha$ F' (F<sup>-</sup>, $\phi$ 80dlacZAM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), supE44, relA1, deoR) $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, *E. coli* BL21(DE3) (F<sup>-</sup>, ompT, hsd S<sub>6</sub>(r<sub>b</sub><sup>-</sup>, m<sub>b</sub><sup>-</sup>), gal dcm (DE3)); плазмиду pGEM1 (Promega, США).

**Выделение РНК из клеток гибридомы** проводили с помощью TRIzol-реагента (Sigma, США) согласно методике производителя.

**Синтез кДНК и амплификацию генов**, кодирующих переменные домены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина мыши, проводили методом ОТ-ПЦР с использованием коммерческого набора Titan one tube RT-PCR (Roche Applied Science, Германия) согласно инструкции производителя. Для синтеза



**Рис. 7.** Нейтрализация вируса КЭ одноцепочечным антителом sc13D6 в реакции ингибирования фокусобразования вирусом КЭ на монослое перевиваемых линий клеток СПЭВ (почки эмбриона свиньи).

фрагмента ДНК, кодирующего переменный домен тяжелой цепи, в реакционную смесь добавляли праймер Vhdir (5') CGGAACCTCGAGGTTMMAGCTG-SAGTC, соответствующий последовательности мРНК, кодирующей FR1-районы тяжелых цепей иммуноглобулинов мыши, и Vhrev (5') TGAGGAGACG-GTGACCCTGGTGCCTTGGCCCCA, комплементарный J-сегментам тяжелых цепей иммуноглобулинов мыши. Праймеры Vhdir и Vhrev содержат в своем составе сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции XhoI и BstEII, соответственно. Синтез фрагмента ДНК, кодирующего переменный домен легкой цепи, проводили с использованием вырожденного праймера Vldir (5') GAYATTGAGCTCACMCAR-WCTMCA, соответствующего последовательности мРНК, кодирующей FR1-районы легких цепей иммуноглобулинов мыши, и Vlrev (5') GGAAGATC-TATACAGTTGGTGCAG, комплементарный J-сегментам легких цепей иммуноглобулинов мыши. Праймеры Vldir и Vlrev содержат в своем составе сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции SacI и BglII, соответственно. Продукты амплификации выделяли из ПЦР-смеси с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, США) согласно инструкции производителя и анализировали в 1.5% агарозном геле.

**Конструирование рекомбинантной плазмидной ДНК pSC13D6.** Для получения гена одноцепочечного антитела Vh- и Vl-фрагменты обрабатывали эндонуклеазами рестрикции XhoI, BstEII и SacI, BglII, соответственно, и лигировали с олигонуклеотидным коннектором, кодирующим линкерный пептид (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>. Коннектор, кодирующий линкерный пептид (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, получали отжигом двух пар олигонуклеотидов (5'-3'):

GTCACCGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGG-CGGTGGT,

GGGTCGGGTGGCGGGCGGATCTGACATTGAGCT;  
 GAGCCACCGCCACCTGAGGAGACG,  
 CAATGTCAGATCCGCCGCCACCCGACCCACCA-  
 CCGCC.

Фрагмент ДНК, кодирующий лидерный пептид пектатлиазы В (pelB), был получен методом ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиды pET (rf11) и олигонуклеотидных праймеров (5'-3') CCGCTCGAGCAGCTGCACCTGGGC, GGAATTCGACCACACTCCCTTG, обеспечивающих в амплификационном фрагменте сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции EcoRI и XhoI. Этот фрагмент, обработанный эндонуклеазами рестрикции EcoRI и XhoI, и ген одноцепочечного антитела, обработанный эндонуклеазами рестрикции XhoI и BglIII, были встроены в плазмиду pGEM1 по сайтам рестрикции EcoRI и BglIII. Полученную в результате плазмиду pSC13D6 анализировали с помощью эндонуклеаз рестрикции EcoRI, XhoI, BstEII, SacI, BglIII. Структуру гена одноцепочечного антитела подтверждали секвенированием. Секвенирование проводили с использованием автоматического секвенатора CEQ™ 2000XL DNA Analysis System (Beckman coulter, США) и наборов CEQ™ DTCS Quick Start Kit (Beckman coulter, США).

**Получение одноцепочечных антител в клетках *E. coli* BL21(DE3).** Культуру клеток трансформировали плазмидной ДНК pSC13D6. Индивидуальный клон после трансформации трижды рассевали до отдельных колоний. Рекомбинантный штамм нарабатывали в питательной среде 2 × YT, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, инкубировали до оптической плотности 0.6–0.8 при 37°C и интенсивном качении, после чего клетки индуцировали 1 mM IPTG в течение 15 ч.

**Получение субклеточных фракций *E. coli*.** Для фракционирования клеток *E. coli* индуцированную культуру центрифугировали в течение 5 мин при 10000 g. Образовавшийся осадок ресуспендировали в буфере STE (200 mM Трис-НСl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 20% сахароза) и выдерживали 30 мин во льду. Полученную суспензию клеток центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g; супернатант представлял собой фракцию периплазматических белков. Образовавшийся осадок клеток ресуспендировали в буфере TE (50 mM Трис-НСl, pH 8.0, 10 mM EDTA), после чего клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Ultrasonic Processor (Cole Parmer Instruments, США) как описано в протоколе [20]. Полученную суспензию клеток центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g; супернатант представлял собой фракцию цитоплазматических белков.

**Очистка одноцепочечного антитела с помощью гель-фильтрации.** Раствор периплазматических белков объемом 2 мл, содержащий одноцепочечное антитело, наносили на хроматографическую ко-

лонку (длина 80 см, диаметр 1.4 см) с сорбентом сефакрил S-300 (Pharmacia, Швеция), уравновешенную буфером, содержащим 10 mM Трис-НСl, pH 7.6; 0.1 M NaCl. На выходе из колонки располагали спектрофотометрический детектор, за которым следовал коллектор фракций. Оптическое поглощение элюата на выходе из колонки регистрировали при 280 нм. Как только фронт достигал выхода колонки, начинали собирать фракции объемом 2 мл. Состав фракций анализировали методом электрофореза в 12% ПААГ с SDS [21]. Фракции, содержащие одноцепочечное антитело, объединяли и осаждали сульфатом аммония (65% от насыщения). Осадок растворяли и проводили диализ против 0.9% раствора NaCl. Концентрацию очищенного одноцепочечного антитела измеряли на спектрофотометре SmartSpec™ 3000 (Bio Rad, США), используя метод Лоури–Фолина [22].

**Иммуноблоттинг.** Рекомбинантный белок Е вируса КЭ разделяли электрофоретически в 12% ПААГ с SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану 0.45 мкм (Millipore, США). После блокирования сайтов неспецифического связывания 3% раствором BSA (Sigma, США) мембрану инкубировали с очищенным одноцепочечным антителом в концентрации 19.6 нг. Связавшееся антитело выявляли при добавлении конъюгата щелочной фосфатазы с антивидовыми антителами (Биосан, Новосибирск) в разведении 1 : 1000. Данный конъюгат содержал антитела, способные связываться с переменными доменами мышинных иммуноглобулинов класса IgG1. Визуализацию иммунного комплекса проводили, добавляя 5-бром-3-индолфосфат (Carl Roth GmbH, Германия) и нитротетразолевый синий (Sigma, США).

**Иммуноферментный анализ.** Одноцепочечное антитело в составе клеточных лизатов тестировали с использованием инактивированного вируса КЭ. На поверхность полистиролового планшета сорбировали инактивированный вирусный препарат (вирус КЭ, штамм 205), в концентрации 200 нг/лунку и после блокировки мест неспецифического связывания 3% раствором BSA инкубировали с последовательными разведениями клеточных лизатов, содержащих одноцепочечное антитело. Иммунные комплексы выявляли добавлением антивидового конъюгата щелочной фосфатазы (Биосан, Новосибирск) в разведении 1 : 1000. В качестве хромогена использовали пара-нитрофенилфосфат (ICN, США). В качестве отрицательного контроля использовали лизаты клеток, несущих векторную плазмиду pGEM1.

**Определение константы аффинности одноцепочечного антитела в растворе.** Очищенное антитело sc13D6 в концентрации  $3.0 \times 10^{-8}$  M инкубировали с последовательными разведениями рекомбинантного белка Е в концентрации от  $1.2 \times 10^{-6}$  M до  $9.3 \times 10^{-9}$  M. Полученные растворы добавляли в лунки с предварительно сорбированным рекомбинантным белком Е в концентрации 200 нг/лунку. Иммун-

ные комплексы выявляли при добавлении антивидового конъюгата щелочной фосфатазы (Биосан, Новосибирск) в разведении 1 : 1000. В качестве хромогена использовали *para*-нитрофенилфосфат.

**Определение гетерофазной константы аффинности одноцепочечного антитела.** На поверхность полистиролового планшета сорбировали рекомбинантный белок E в концентрации 200 нг/лунку и после блокировки мест неспецифического связывания 3% раствором BSA, инкубировали с последовательными разведениями очищенного антитела sc13D6. Иммунные комплексы выявляли при добавлении антивидового конъюгата щелочной фосфатазы (Биосан, Новосибирск) в разведении 1 : 1000. В качестве хромогена использовали *para*-нитрофенилфосфат.

**Вируснейтрализующая активность одноцепочечного антитела.** В стерильном 96-луночном планшете на питательной среде RPMI 1640 с добавлением 2% инактивированной фетальной сыворотки готовились серийные двукратные разведения одноцепочечного антитела и контрольного лизата клеток BL21(DE3), начиная с разведения 1 : 20, а также рабочее разведение вируса КЭ, соответствующее 500 ФОЕ (фокусобразующих единиц)/лунку. К серийным разведениям исследуемого одноцепочечного антитела и контроля добавляли рабочее разведение вируса, после чего смеси инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Затем содержимое лунок переносили на соответствующие лунки 2-суточного монослоя клеток СПЭВ в 96-луночном планшете, после чего планшет с монослоем инкубировали при 37°C в течение 42 ч. Для окрашивания инфицированных клеток в лунки добавляли охлажденный ацетон на 10–15 мин. После двукратной промывки лунок фосфатно-солевым буфером на 30 мин вносили раствор МКА мыши [23] против гликопротеина E вируса КЭ. Иммунный комплекс выявляли добавлением антивидового конъюгата пероксидазы хрена (Sigma, США) в разведении 1 : 3000. В качестве хромогена использовали 3-амино-9-этилкарбазол (Sigma, США). Через 30 мин инкубации субстратный раствор заменяли на фосфатно-солевой буфер и окрашенные клетки учитывали в микроскопе Olympus SK40. Величину IC<sub>50</sub>, определяемую, как концентрация одноцепочечного антитела, при которой происходит уменьшение количества окрашенных клеток (фокусов) в лунке на 50% по сравнению с лунками, инфицированными вирусом КЭ без добавления одноцепочечного антитела, рассчитывали с помощью пробит-анализа (метод Финни) [24] с использованием программы ProbitLin.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность Е.В. Протопоповой (Федеральное государствен-

ное учреждение науки ГНЦ ВБ “Вектор”) за плодотворное обсуждение полученных результатов.

Работа была поддержана администрацией Новосибирской области, проект ДН-01-06.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Злобин В.И. // Вопросы вирусологии. 2005. № 5. С. 26–32.
2. Локтев В.Б., Терновой В.А., Немесов С.В. // Вопросы вирусологии. 2007. № 5. С. 6–10.
3. Jennifer M., George G. // Annu. Rev. Biomed. Eng. 2000. V. 2. P. 339–376.
4. Kiprijanov S.M., Le Gall F. // Molecular Biotechnology. 2004. V. 26. P. 39–60.
5. Hauschild J., Faro H.P., Pack P., Pluckthun A. // Antibody Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals. 1995. V. 8. P. 111–129.
6. Schier R., Bye J., Apell G. // J. Mol. Biol. 1996. V. 255. P. 28–43.
7. Беспалов И.А., Шиянов П.А., Лукашевич Л.В. // Молекулярная биология. 1995. № 27. С. 451–460.
8. Condra J.H., Sardana V.V., Tomassini J.E. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 2292–2295.
9. Jiang W., Bonnert T.P., Venugopal K., Gould E.A. // Virology. 1994. V. 200. P. 21–28.
10. Тукунова Н.В., Николенко Г.В., Протопопова Е.В., Котелкин А.Т., Локтев В.Б., Белавин П.А., Немесова Н.А., Дев С.М., Ильичев А.А. // Вопросы вирусологии. 1999. № 44. С. 12–15.
11. Николенко Г.Н., Протопопова Е.В., Ильичев А.А., Коновалова С.Н., Карпенко Л.И., Локтев В.Б., Порываева В.А., Тукунова Н.В. // Вопросы вирусологии. 2002. № 47. С. 31–36.
12. Леванов Л.Н., Матвеев Л.Э., Юн Т.Э., Лебедев Л.Р., Швалов А.Н., Байков И.К., Матвеева В.А., Рухтер В.А., Тукунова Н.В. // Сибирский медицинский журн. 2008. № 7. С. 38–43.
13. Tsekhankovskaya N.A., Matveev L.E., Rubin S.G., Karavanov A.S., Pressman E.K. // Virus Research. 1993. V. 30. P. 1–16.
14. Scerra A., Pluckthun A. // Science. 1988. V. 240. P. 1038–1041.
15. Немесова Н.А., Белавин П.А., Малыгин Э.Г., Руквишиников М.Ю. // Рекомбинантная плазмидная ДНК PGSDel, кодирующая белок E вируса клещевого энцефалита и штамм *Escherichia coli* – продуцент рекомбинантного белка E вируса клещевого энцефалита: Патент РФ. № 2136754. 1999.
16. Bobrovnik S.A. // J. Biochem. Biophys. Methods. 2003. V. 57. P. 213–236.
17. Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E. // J. of Immunological Methods. 1985. V. 77. P. 305–319.
18. Beatty J.D., Beatty B.G., Vlahos W.G. // J. of Immunological Methods. 1987. V. 100. P. 173–179.
19. Reading S.A., Dimmock N.J. // Archives of Virology. 2007. V. 152. P. 1047–1059.



20. Гловер Д. Новое в клонировании ДНК. М.: Мир, 1989.
21. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
22. Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991.
23. Протопопова Е.В., Хусаинова А.Д., Коновалова С.Н., Локтев В.Б. // Вопросы вирусологии. 1996. № 2. С. 50–53.
24. Финни Д. Введение в теорию планирования экспериментов. М.: Мир, 1970.

## Neutralizing Single-Chain Antibodies Against the Tick-Borne Encephalitis Virus

L. N. Levanov<sup>a,b</sup>, L. E. Matveev<sup>a,b</sup>, T. E. Yun<sup>a,b</sup>, E. P. Goncharova<sup>a</sup>, L. R. Lebedev<sup>a</sup>,  
A. N. Shvalov<sup>a</sup>, A. B. Ryzhykov<sup>a</sup>, I. K. Baikov<sup>a,b</sup>, V. A. Matveeva<sup>b</sup>,  
V. A. Rikhter<sup>b</sup>, and N. V. Tikunova<sup>a,b</sup>#

#Phone: +7 (383) 336-5895; e-mail: tikunova@vector.nsc.ru

<sup>a</sup> FGUN Vector State Scientific Center of Virology and Biotechnology, pos. Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, 630559 Russia

<sup>b</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

A recombinant pSC13D6 plasmid DNA was constructed based on cDNA fragments of genes encoding variable domains of heavy and light chains of the MKA13D6 monoclonal antibody against glycoprotein of the tick-borne encephalitis (TBE) virus. This plasmid provided expression in *Escherichia coli* cells of the scl3D6 single-chain antibody against the TBE virus. The produced antibodies could bind to the TBE virus, strain 205, and the TBE virus recombinant E protein. The affinity constant of purified scl3D6 was  $(3.0 \pm 0.2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  for the equilibrium state and  $(2.8 \pm 0.3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  in the case of antigen–antibody formation on the surface. The obtained single-chain antibody could inhibit the infection potency of the TBE virus on a monolayer of eukaryotic cells. The calculated  $\text{IC}_{50}$  value for scl3D6 was 16.7  $\mu\text{g/ml}$ .

*Key words:* affinity, single-chain antibodies, tick-borne encephalitis virus