МЕТОДЫ

УДК 57.083.3

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ШИРОКО НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА ТИПА А

Т.К. Алиев[1,*], И.Г. Дементьева[2], В.А. Топорова[3], М.Н. Боков[2], Л.П. Позднякова[2], В.С. Рыбченко[4], Д.А. Долгих[5], П.Г. Свешников[2], М.П. Кирпичников[5]

[1] *Кафедра химической энзимологии, химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;*
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3;
[2] *Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения;*
Россия, 117638, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8;
[3] *Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;*
Россия, 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;
[4] *кафедра биохимии и* [5]*кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;*
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
[*] *e-mail: ta12345@list.ru*

Для исследования возможности создания на основе широко нейтрализующего антитела против вируса гриппа А различных белковых конструкций для диагностики было проведено конструирование двух рекомбинантных белков — Fab-фрагмента антитела и белка Fab-mCherry, представляющего собой гибрид Fab-фрагмента и флуоресцентного белка mCherry. Оба белка были экспрессированы в клетках *Escherichia coli* и выделены в функционально активном состоянии из культуральной жидкости. Показано, что Fab-фрагмент антитела взаимодействует со всеми одиннадцатью протестированными штаммами подтипов H1N1 и H3N2 вируса гриппа А. При этом наибольшая сила связывания наблюдается в отношении штаммов подтипа H1N1, что соответствует иммунохимическому профилю “родительского антитела”. Сравнение констант диссоциации комплексов Fab-фрагмента антитела и белка Fab-mCherry с вирусными частицами штамма A(H1N1)/Solomon Islands/03/06 показало, что присоединение белка mCherry не влияет на антиген-связывающие свойства Fab-фрагмента антитела.

Ключевые слова: *вирус гриппа А, широко нейтрализующие антитела, белок mCherry, Fab-фрагмент, экспрессия рекомбинантных белков, Escherichia coli.*

Ежегодно от 5 до 15% населения Земли заболевает гриппом, для 250–500 тыс. человек данная инфекция оказывается смертельной [1]. Из трех типов вируса гриппа наиболее вирулентным является тип А, способный поражать человека и животных. Ряд подтипов данного типа явились причиной возникновения эпидемий и пандемий. Причиной такой высокой вирулентности вируса гриппа А (ВГА) является изменчивость поверхностных антигенов вирусного капсида — гемагглютинина и нейраминидазы.

Получение иммунной сыворотки, обладающей широкой специфичностью в отношении различных подтипов ВГА, в течение многих лет является одной из наиболее приоритетных задач современной фармакологии. При этом в ряде случаев были описаны успешные примеры получения антител, гетероспецифичных в отношении некоторых из известных на тот момент 16 подтипов [2], однако до недавнего времени не удавалось получить антитело, обладающее специфичностью в отношении всех подтипов ВГА. Значительный прорыв в данной области был достигнут в результате предпринятого масштабного скрининга более 100 тыс. отдельных культивированных антителопродуцирующих В-клеток нескольких доноров, у которых наблюдали значительную гетеротипичность иммунного ответа в отношении ряда подтипов ВГА [3]. В результате было найдено уникальное нейтрализующее антитело FI6, обладающее способностью связывать рекомбинантные и природные гемагглютинины подгрупп 1 и 2 со значениями параметра EC_{50} от 10 до 270 нг/мл. На мышах и хорьках, инфицированных штаммами ВГА H1N1 и H5N1 в летальной дозе, было показано, что полная защита достигается при введении данного антитела в дозах от 2 до 20 мг/кг веса.

Обнаружение антитела FI6 открывает новые возможности для создания вакцин, терапевтических препаратов, а также средств диагностики ВГА различных подтипов. При этом в качестве терапевтических или диагностических агентов также могут использоваться различные белковые молекулы, созданные с применением биоинженерных подходов и содержащие антиген-связывающие области искомого антитела. Разработано и описано достаточное большое число различных молекуляр-

ных форматов производных иммуноглобулинов для использования в диагностике и фармакологии [4]. Многие из таких конструкций основаны на использовании одноцепочечных антител и Fab-фрагментов. Данные белковые модули сохраняют антиген-связывающие свойства вариабельных доменов исходного антитела и, в отличие от полноразмерных антител, хорошо экспрессируются в различных клетках, в частности, дрожжах и клетках *Escherichia coli*.

Цель настоящей работы заключалась в получении и исследовании рекомбинантного Fab-фрагмента широкоспецифичного антитела FI6, а также белка Fab-mCherry, представляющего собой гибрид Fab-фрагмента и флуоресцентного белка mCherry [5]. В задачи исследования входило выяснение возможности экспрессии данных рекомбинантных белков в активном виде в клетках *E. coli* и их способности к высокоаффиному взаимодействию с ВГА различных подтипов.

Материалы и методы

Конструирование нуклеотидных последовательностей вариабельных доменов антитела FI6 осуществляли методом химико-ферментативного синтеза с использованием метода полимеразной цепной реакции и набора олигонуклеотидных праймеров с попарно перекрывающимися концевыми частями. Сборку бицистронной экспрессионной плазмиды для получения Fab-фрагмента антитела FI6 в клетках *E. coli*, биосинтез и очистку белка осуществляли по схеме, описанной ранее [6, 7]. Полученные нуклеотидные последовательности вариабельных доменов объединяли с константными доменами иммуноглобулина G человека (IgG1, каппа). Последовательность ДНК, кодирующую легкую цепь Fab-фрагмента, встраивали в вектор pTrc99A, содержащий предварительно клонированный ген лидерного пептида stII термостабильного энтеротоксина II *E. coli*. Последовательность ДНК, кодирующую тяжелую цепь Fab-фрагмента, встраивали во вспомогательный вектор pBluescript SK(+), содержащий последовательность лидерного пептида stII, последовательность Шайна-Дальгарно и додекагистидиновый таг. На следующем этапе экспрессионную кассету, содержащую тяжелую цепь Fab-фрагмента и перечисленные выше компоненты вспомогательного вектора, встраивали в вектор pTrc99A, содержащий легкую цепь. В результате получали бицистронный экспрессионный вектор pTrcLHFI6, в котором транскрипция легкой и тяжелой цепей Fab-фрагмента осуществлялась с единственного trc-промотора, а инициация трансляции каждой из цепей происходила независимо на участках, расположенных перед каждой кодирующей последовательностью в бицистроне.

Ген флуоресцентного белка mCherry для создания гибридного белка с FabFI6 получали методом ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиды pmCherry-C1 (Clontech, США) и специфических олигонуклеотдных праймеров, содержащих сайты рестрикции XhoI и SalI. Полученный фрагмент, не содержащий N-концевой аминокислотный остаток метионина, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции XhoI и SalI и встраивали по сайту XhoI во вспомогательный вектор, содержащий додекагистидиновый таг. Полученную плазмиду обрабатывали рестриктазами XhoI и HindIII, фрагмент длиной 757 п.н., содержащий ген белка pCherry с додекагистидиновым тагом, лигировали с фрагментом длиной 5583 п.н., полученным в результате обработки плазмиды pTrcLHFI6 той же парой рестриктаз. В результате получали вектор pTrcLHFI6-Ch, в котором белок Cherry располагался непосредственно на С-конце константного C_H1 домена тяжелой цепи антитела FI6.

Для продукции рекомбинантных Fab-фрагментов антитела FI6 и гибридного белка FabFI6-mCherry в клетках *E. coli* штамма BL-21 (DE-3) использовали метод автоиндукции [8], согласно которому клетки выращивали в питательной среде 2ZY, содержащей 2 мМ $MgSO_4$, 25 мМ Na_2HPO_4, 25 мМ KH_2PO_4, 50 мМ NH_4Cl, 5 мМ Na_2SO_4, 0,5% глицерина, 0,05% глюкозы, 0,2% моногидрата α-лактозы и ампициллин, на качалке в течение 48 ч при 32ºС и 220 об/мин. По окончании культивирования клетки осаждали центрифугированием, рекомбинантные белки выделяли из среды культивирования методом металл-аффинной хроматографии на носителе Co^{2+}-иминодиацетат-сефароза (GE Healthcare, США), как описано ранее [7].

Для иммунохимической характеристики Fab-фрагмента FI6 использовали набор высокоочищенных реликтовых и актуальных штаммов ВГА (табл. 1) производства компании Hytest Ltd. (Турку, Финляндия) и НИИ гриппа РАМН (Санкт-Петербург, Россия), полученных из зараженных куриных эмбрионов методом последовательных ультрацентрифугирований с использованием градиента плотности сахарозы с последующим инактивированием мертиолатом в течение 24 ч. Инактивацию вирусов подтверждали на культуре клеток MDCK. Для проведения непрямого иммуноферментного анализа использовали мышиные моноклональные антитела (МоАт) F8 против нуклеопротеина и C102 против гемагглютинина H1 ВГА (оба антитела получены ранее во Всероссийском научном центре молекулярной диагностики и лечения). Для подтверждения специфичности рекомбинантных белков использовали метод иммуноблоттинга. Для этого на первом этапе проводили электрофоретическое разделение антигенов различных штаммов ВГА подтипов H1N1 и H3N2 в 12%-ном полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Перенесенные белки выявляли с антивидовым пероксидазным конъюгатом антител козы

Таблица 1

Сведения о вирусных препаратах, использованных для иммунохимической характеристики рекомбинантных белков, полученных в данной работе

Поставщик	Подтип	Штамм/год выделения
Hytest Ltd 8IN73	Influenza A (H1N1)	**A/Taiwan/1/86**
Hytest Ltd 8IN73-2	Influenza A (H1N1)	**A/Beijing/262/95**
Hytest Ltd 8IN73-3	Influenza A (H1N1)	A/New Caledonia/20/99
Hytest Ltd 8IN73-4	Influenza A (H1N1)	A/Solomon Islands/03/06
НИИ гриппа РАМН	Influenza A (H1N1)	A/California/07/09
Hytest Ltd 8IN74	Influenza A (H3N2)	**A/Samara/222/99=A/Shangdong/9/93**
Hytest Ltd 8IN74-1	Influenza A (H3N2)	**A/Panama/2007/99**
Hytest Ltd 8IN74-2	Influenza A (H3N2)	**A/Kiev/301/94**
Hytest Ltd 8IN74-3	Influenza A (H3N2)	A/Wisconsin/67/05
Hytest Ltd 8IN74-4	Influenza A (H3N2)	A/Brisbane/10/07
НИИ гриппа РАМН	Influenza A (H3N2)	**A/Sydney/5/97**

против IgG мыши (для антител F8 и C102) и пероксидазным конъюгатом МоАт 4G7 против каппа-цепи человека (для Fab-фрагмента FI6) в течение 1 ч при 37°C.

Для определения аффинности Fab-фрагмента и гибридного белка FabFI6-Cherry использовали метод непрямого иммуноферментного анализа (ИФА), который позволяет определять концентрацию свободных антител в смеси антиген-антитело после достижения равновесия при комнатной температуре [9]. В качестве антигена использовали штамм A(H1N1)/Solomon Islands/03/06. Константу диссоциации рассчитывали по уравнению Клотца [10].

Результаты и обсуждение

Для синтеза генов вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей антитела FI6, широкоспецифичного в отношении известных подтипов ВГА, нами были взяты аминокислотные последовательности FI6VHv3 для тяжелой цепи и FI6VKv2 для легкой цепи [3]. Данные последовательности представляют собой модифицированную версию исходного антитела FI6, приближенную к последовательности вариабельных доменов зародышевых линий иммуноглобулинов человека. На основании аминокислотной последовательности с учетом частоты встречаемости кодонов в генах *E. coli* были составлены нуклеотидные последовательности вариабельных доменов легких и тяжелых цепей и осуществлен химико-ферментативный синтез соответствующих фрагментов ДНК.

Для экспрессии рекомбинантного Fab-фрагмента антитела FI6 была сконструирована бицистронная плазмида pTrcLHFI6. Присутствие лидерного пептида stII термостабильного энтеротоксина *E. coli* на N-концевой части транслируемых легкой и тяжелой цепей позволяло осуществлять транспорт зрелого Fab-фрагмента антитела непосредственно в среду культивирования.

Для того, чтобы оценить, может ли Fab-фрагмент антитела FI6 быть использован в качестве основного компонента рекомбинантных конструкций без значительного изменения его антиген-связывающих свойств, мы предложили осуществить получение и исследовать аффинность гибридного белка FabFI6-mCherry. Белок mCherry представляет собой мутантную форму флуоресцентного белка DsRed из *Discosoma sp*. [5].

На основе нуклеотидной последовательности, кодирующей mCherry, была получена экспрессионная плазмида pTrcLHFI6-Ch, обеспечивающая биосинтез гибридного белка FabFI6-mCherry в клетках *E. coli*.

Рекомбинантные белки FabFI6 и FabFI6-mCherry экспрессировали методом автоиндукции клеток *E. coli* штамма BL-21 (DE-3) трансформированными плазмидами pTrcLHFI6 и pTrcLHFI6-Ch. Белки выделяли из концентрированной среды культивирования методом металл-аффинной хроматографии. Результаты гель-электрофоретического анализа очищенных белков в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях приведены на рис. 1.

Оказалось, что в невосстанавливающих условиях подвижность белка FabFI6 соответствует теоретически рассчитанной молекулярной массе 49,2 кДа, а в присутствии β-меркаптоэтанола происходит диссоциация межцепочечной дисульфидной связи с образованием тяжелой и легкой цепей Fab-фрагмента. Молекулярная масса белка FabFI6-mCherry составляет 77,9 кДа. Молекулярная масса его гибридной тяжелой цепи, содержащей на C-конце белок mCherry, составляет ~54 кДа. Анализ белка

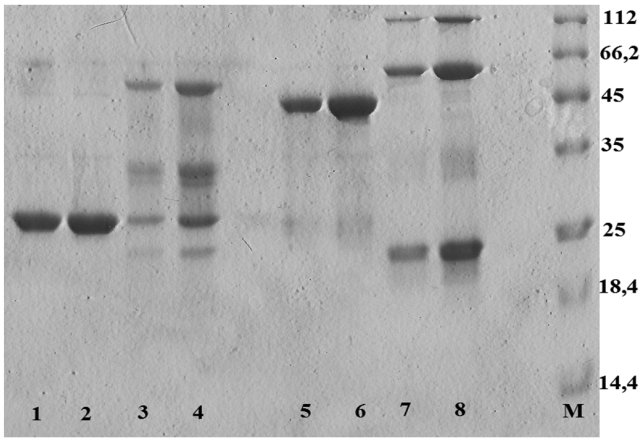

Рис. 1. Гель-электрофоретический анализ (12%-ный полиакриламидный гель в присутствии додецилсульфата натрия) полученных после металл-аффинной хроматографии белков FabFI6 (дорожки 1, 2, 5, 6) и FabFI6-mCherry (дорожки 3, 4, 7, 8). М — белковые маркеры молекулярных масс. Образцы на дорожках 1–4 подвергались восстановлению с помощью β-меркаптоэтанола. Количество белка в образцах: дорожки 1 и 5 — 2 мкг белка; дорожки 2 и 6 — 1 мкг белка; дорожки 4 и 8 — 2,5 мкг белка; дорожки 3 и 7 — 1,25 мкг белка

FabFI6-mCherry после электрофореза в восстанавливающих и в невосстанавливающих условиях свидетельствует о наличии полосы ~23 кДа, отличающейся по своей электрофоретической подвижности от легкой цепи. Появление данного фрагмента описано в работе Гросса [11], в которой показано, что при кипячении электрофоретических образцов происходит гидролиз лабильной ациламинной связи в хромофоре белка DsRed между остатками Phe 65 и Gln 66.

Была исследована антигенная специфичность рекомбинантного белка FabFI6 в отношении ряда штаммов подтипов H1N1 и H3N2, относящихся к разным подгруппам ВГА (табл. 1).

Необходимо отметить, что ранее [3] проводилось исследование взаимодействия ряда указанных штаммов с полноразмерным антителом FI6. Нами для иммунохимического анализа FabFI6 также были дополнительно использованы другие штаммы H1N1 и H3N2 (выделены жирным шрифтом в табл. 2), не использованные в работе Корти [3].

Из результатов непрямого ИФА FabFI6 с различными штаммами ВГА (табл. 2), следует, что рекомбинантный Fab-фрагмент антитела FI6 сохраняет свойство “родительского антитела” проявлять специфичность в отношении штаммов подтипов подгрупп 1 и 2 гемагглютининов. Так же, как и полноразмерное антитело человека, FabFI6 обладает большей аффинностью к штаммам подтипа H1N1, чем к H3N2.

На рис. 2 представлены результаты сравнения кросс-реактивности рекомбинантного FabFI6 с МоАт F8 и C102. Результаты непрямого ИФА по-

Таблица 2

Результаты титрования FabFI6 в непрямом ИФА (оптическая плотность при длине волны 450 нм) с использованием для иммобилизации четырех штаммов ВГА/H1N1 и пяти штаммов ВГА/H3N2; штамм B/Tokyo/53/99 вируса гриппа B использован в качестве отрицательного контроля

Антиген FabFI6, мкг/мл	A(H1N1)/				A(H3N2)/					B/Tokyo/53/99
	Taiwan/1/86	Beijing/262/95	New Caledonia/20/99	Solomon Islands/03/06	Samara/222/99	Panama/2007/99	Kiev/301/94	Wisconsin/67/05	Brisbane/10/07	
1	*	*	*	*	0,776	2,264	0,887	1,123	1,185	0,394
0,3	*	*	*	*	0,331	1,419	0,213	0,261	0,316	0,176
0,1	*	*	*	*	0,297	1,340	0,117	0,122	0,116	0,109
0,03	2,638	2,669	2,444	2,953	0,163	1,004	0,086	0,084	0,068	0,092
0,01	1,359	1,140	0,767	1,567	0,109	0,572	0,050	0,074	0,044	0,097
0,003	0,625	0,319	0,255	0,422	0,055	0,247	0,036	0,060	0,034	0,138
0,001	0,337	0,120	0,163	0,170	0,030	0,123	0,026	0,050	0,031	0,178

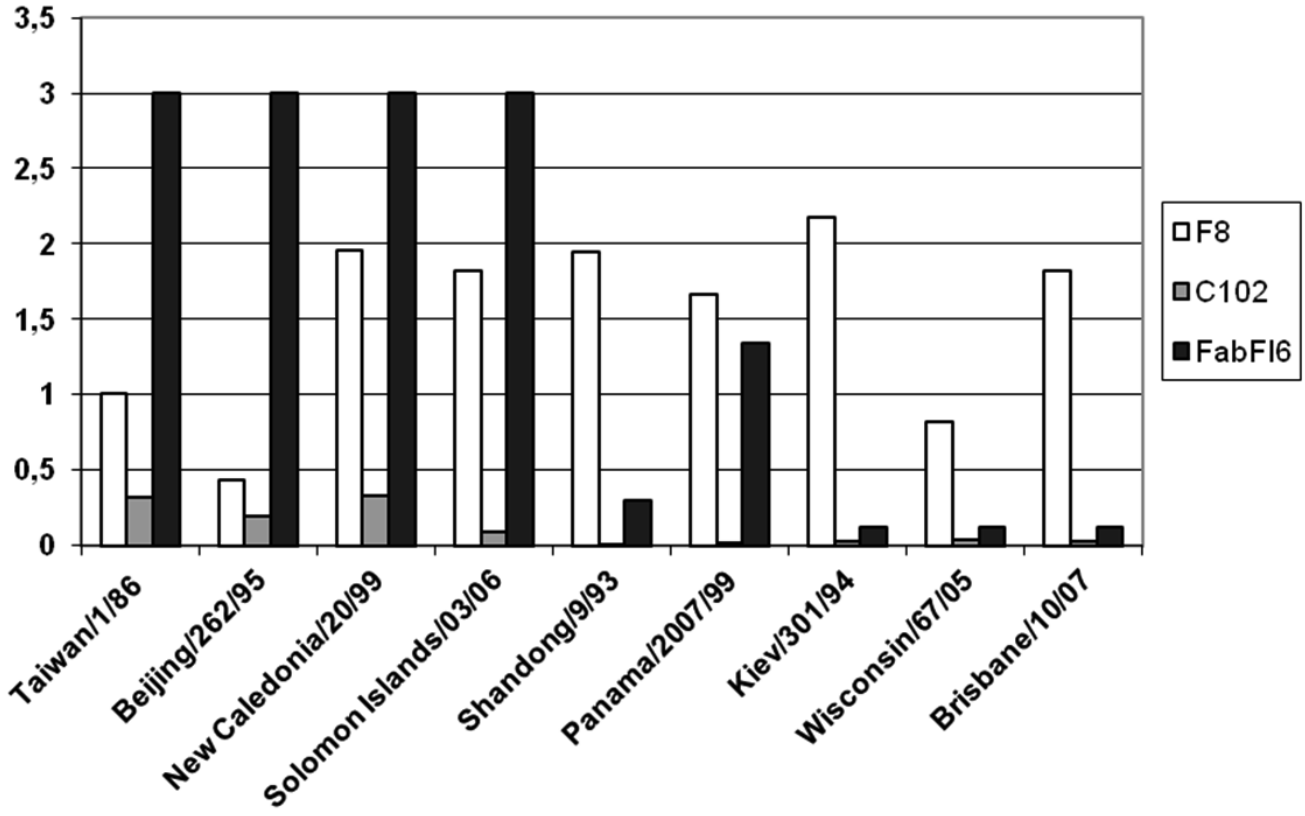

Рис. 2. Диаграмма кросс-реактивности МоАтF8, C102 и FabFI6 по данным непрямого ИФА с иммобилизованными четырьмя штаммами ВГА/H1N1 и пятью штаммами ВГА/H3N2 при концентрации антител 100 нг/мл. По оси у — оптическая плотность при длине волны 450 нм при концентрации МоАт 0,1 мкг/мл

казывают, что МоАт F8, направленное против консервативного эпитопа ВГА, взаимодействует со всеми исследованными штаммами подтипов H1N1 и H3N2. МоАт C102 узнает молекулы гемагглютинина только подтипа H1N1. FabFI6 связывается с гемагглютининами всех штаммов, причем подтип H1N1 узнается лучше, чем подтип H3N2.

Специфичность FabFI6 к гемагглютининам ВГА различных штаммов подтверждали методом иммуноблоттинга (рис. 3). Из результатов иммуноблоттинга следует, что FabFI6 взаимодействует как с цельными гемагглютининами HA0 всех использованных штаммов, так и преимущественно с фрагментами гемагглютининов HA1 и HA2, которые образуются при проведении электрофореза антигенов ВГА в восстанавливающих условиях. Гидролиз цельных гемагглютининов при проведении гель-электрофореза в восстанавливающих условиях наблюдали при анализе рекомбинантных гемагглютининов [12]. Способность FabFI6 взаимодействовать с HA1 и HA2 объясняется тем, что МоАт FI6 направлено против F-субдомена гемагглютинина, который находится на стыке доменов H1 и H2 [3]. При этом тяжелая цепь антитела взаимодействует с доменом H1, а легкая цепь — с альфаспиралью из домена H2.

В совокупности данные ИФА и иммуноблоттинга свидетельствуют о том, что экспрессируемый в клетках *E.coli* Fab-фрагмент антитела FI6 является функционально-активным и проявляет специфичность по отношению ко всем исследованным штаммам ВГА.

Для оценки влияния присоединения белка mCherry к С-концевой части тяжелой цепи FabFI6 на антиген-связывающую активность антитела нами были определены константы диссоциации ($K_Д$) комплекса антиген-антитело для FabFI6 и FabFI6-mCherry. Усредненные значения $K_Д$ составили $3{,}8\times10^{-9}$ М для FabFI6 и $3{,}1\times10^{-9}$ М для FabFI6-mCherry. Данный результат свидетельствует о том, что антиген-связывающая активность гибридного белка не уменьшается по сравнению с этим показателем для исходного Fab-фрагмента.

Проведенные исследования показали, что рекомбинантный белок FabFI6, сконструированный на основе вариабельных доменов антитела FI6, широкоспецифичного к гемагглютининам ВГА, экспрессируется в клетках *E. coli* в функциональном состоянии. По данным иммунохимического анализа с использованием одиннадцати штаммов ВГА подтипов H1N1 и H3N2 FabFI6 демонстрирует кроссспецифичность, сопоставимую с данным параметром родительского антитела [3]. Сравнение аффинности белков FabFI6 и FabFI6-mCherry показало, что рекомбинантный белок FabFI6 может быть успешно использован в качестве базового модуля для получения на его основе рекомбинантных конструкций без изменения антиген-связывающих свойств.

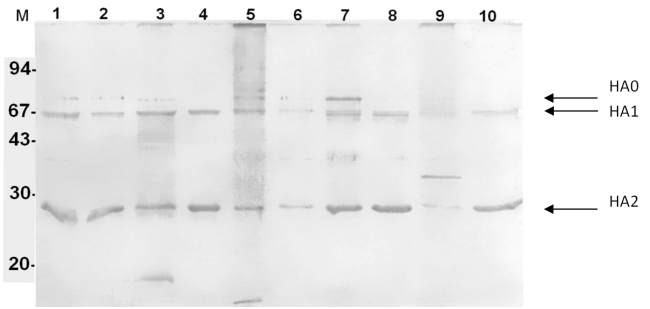

Рис. 3. Иммуноблот антигенов ВГА разных штаммов с FabFI6 в восстанавливающих условиях после разделения в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Дорожки с 1 по 5 — ВГА/H1N1, дорожки с 6 по 10 — ВГА/H3N2, дорожка М — стандарты молекулярной массы, кДа; дорожка 1 — A/Taiwan/1/86, дорожка 2 — A/Beijing/262/95, дорожка 3 — A/New Caledonia/20/99, дорожка 4 — A/Solomon Islands/03/06, дорожка 5 — A/California/07/09, дорожка 6 — A/Samara/222/99, дорожка 7 — A/Panama/2007/99, дорожка 8 — A/Kiev/301/94, дорожка 9 — A/Wisconsin/67/05, дорожка 10 — A/Brisbane/10/07

Работа выполнена при финансовой поддержке субсидии (Соглашение № 14.607.21.0060), выделяемой Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0060).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Graham-Rowe D.* Epidemiology: Racing against the flu // Nature. 2011. Vol. 480. N 7376. P. S2–S3.

2. *Wrammert J., Koutsonanos D., Li G.M.* et al. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection // J. Exp. Med. 2011. Vol. 208. N 1. P. 181–193 (Erratum in: J. Exp. Med. 2011. Vol. 208. N 2. P. 411).

3. *Corti D., Voss J., Gamblin S.J. et. al.* A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins // Science. 2011. Vol. 333. N 6044. P. 850–856.

4. *Деев С.М., Лебеденко Е.Н.* Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 1. С. 32–50.

5. *Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N., Palmer A.E., Tsien R.Y.* Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp*. red fluorescent protein // Nat. Biotechnol. 2004. Vol. 22. N 12. P. 1567–1572.

6. *Kalinichenko A.A., Toporova V.A., Panina A.A., Aliev T.K., Kryukova E.A., Shemchukova O.B., Solopova O.N., Pozdnyakova L.P., Sveshnikov P.G., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P.* Development and characterization of antibodies against aflatoxins // Russ. J. Bioorg. Chem. 2010. Vol. 36. N 1. P. 122–132.

7. *Larina M.V., Aliev T.K., Solopova O.N., Pozdnyakova L.P., Korobova S.V., Yakimov S.A., Sveshnikov P.G., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P.* Neutralizing monoclonal and chimeric antibodies to human interferon-γ // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. Vol. 41. N 3. P. 316–326.

8. *Studier F. W.* Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures // Protein Expr. Purif. 2005. Vol. 41. N. 1. P. 207–234.

9. *Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohaniance L., Goldberg M.E.* Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay // J. Immunol. Methods. 1985. Vol. 77. N 2. P. 305–319.

10. *Klotz I.M.* // The Proteins. Vol. 1. / Eds. I.M. Klotz, H. Neurath, and K. Bailey. N.Y.: Academic Press, 1953. 727 p.

11. *Gross L.A., Baird G.S., Hoffman R.C., Baldridge K.K., Tsien R.Y.* The structure of the chromophore whithin DsRed, a red fluorescent protein from coral // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. N 22. P. 11990–11995.

12. *Feshchenko E., Rhodes D.G., Felberbaum R., McPherson C., Rininger J.A., Post P., and Cox M.M.J.* Pandemic influenza vaccine: characterization of A/California/07/2009 (H1N1) recombinant hemagglutinin protein and insights into H1N1 antigen stability // BMC Biotechnology. 2012. Vol. 2012. DOI: 10.1186/1472-6750-12-77.

Поступила в редакцию
12.11.2015

DEVELOPMENT AND PROPERTIES OF RECOMBINANT PROTEINS BASED ON THE BROADLY NEUTRALIZING ANTIBODY TO INFLUENZA A VIRUS

***T.K. Aliev*[1,*], *I.G. Dement'yeva*[2], *V.A. Toporova*[3], *M.N. Bokov*[2], *L.P. Pozdnyakova*[2], *V.S. Rybchenko*[4], *D.A. Dolgikh*[5], *P.G. Sveshnikov*[2], *M.P. Kirpichnikov*[5]**

[1] *Department of Chemical Enzymology, School of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–3, Moscow, 119234, Russia;*
[2] *Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy, Simferopol Bulvar 8, Moscow, 117638, Russia;*
[3] *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, GSP-7, Moscow, 117997, Russia;*
[4] *Department of Biochemistry and* [5]*Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia*
[*] *e-mail: ta12345@list.ru*

We studied the possibility of using a broadly neutralizing anti-influenza A antibody as a module for the development of different protein constructs for diagnostics. For this purpose we constructed two recombinant proteins — an antibody Fab-fragment and Fab-mCherry, which is

a hybrid of the Fab-fragment and a fluorescent protein mCherry. Both proteins were expressed in *Escherichia coli* cells and purified in a functionally active state from cultivation medium. The antibody Fab-fragment was shown to bind all eleven tested strains of the influenza A H1N1 and H3N2 subtypes. The stronger binding was observed for the group I hemagglutinins that correlates with the immunochemical profile of the parental antibody. Comparison of the dissociation constants of complexes of the antibody Fab-fragment and Fab-mCherry with A(H1N1)/Solomon Islands/03/06 virus particles demonstrated that the attachment of mCherry protein did not interfere with the antigen-binding properties of the antibody Fab-fragment.

Key words: *influenza A virus, broadly neutralizing antibodies, mCherry protein, Fab-fragment, expression of recombinant proteins, Escherichia coli.*

Сведения об авторах:

Алиев Теймур Кантамирович — науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ. Тел.: 8-495-330-66-38; e-mail: ta12345@list.ru

Дементьева Ирина Григорьевна — ст. науч. сотр. Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения. Тел.: 8-499-613-23-65; e-mail: irina.dementieva@mail.ru

Топорова Виктория Александровна — мл. науч. сотр. Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел.: 8-495-330-66-38; e-mail: rhuta@rambler.ru

Боков Максим Николаевич — науч. сотр. Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения. Тел.: 8-499-613-23-65; e-mail: schpundic@gmail.com

Позднякова Любовь Петровна — науч. сотр. Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения. Тел.: 8-499-613-23-65; e-mail: plp1810@inbox.ru

Рыбченко Владислав Сергеевич — студент биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-330-66-38; e-mail: vladislavrusia@yandex.ru

Долгих Дмитрий Александрович — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-336-80-11; e-mail: dolgikh@nmr.ru

Свешников Петр Георгиевич — докт. биол. наук, проф., генеральный директор Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения. Тел.: 8-499-613-23-65; e-mail: petersveshnikov@list.ru

Кирпичников Михаил Петрович — академик РАН, проф., докт. биол. наук, декан, зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru