

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА



*На правах рукописи*

АЛИЕВ Теймур Кантамирович

РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ  
РЕКОМБИНАНТНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА А, СПЕЦИФИЧНЫХ К  
ГЕМАГГЛЮТИНИНУ ВИРУСА ГРИППА А

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва - 2018

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета и на кафедре биоинженерии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Научный руководитель:**

**Кирпичников Михаил Петрович,**  
доктор биологических наук, профессор, академик РАН,  
декан биологического факультета Московского  
государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Официальные оппоненты:**

**Смирнов Иван Витальевич,**  
доктор химических наук,  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт биоорганической  
химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А  
Овчинникова РАН, главный научный сотрудник  
группы комбинаторных методов конструирования  
биокатализаторов

**Киселев Всеволод Иванович,**  
доктор биологических наук, профессор, член-корр. РАН,  
ФГБУ Национальный медицинский исследовательский  
центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени  
академика В.И. Кулакова, Институт онкогинекологии и  
маммологии, заместитель директора института

**Федоров Алексей Николаевич,**  
доктор биологических наук,  
Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»,  
заместитель директора по науке

Защита состоится «26» июня 2018 г. в «15:00» часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.08 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 11, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/117774824/>

Автореферат диссертации разослан: « 25 » мая 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета МГУ.02.08,  
кандидат химических наук

*Сакодынская*

Сакодынская И.К.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Иммуноглобулины класса А являются основными компонентами гуморального иммунитета слизистого эпителия. Представляя собой первичный барьер на пути проникновения патогенов в организм человека через слизистые оболочки, иммуноглобулины класса А способны задействовать различные механизмы нейтрализации вирусов: блокировать их взаимодействие с поверхностью клеток человека, осуществлять внутриклеточную нейтрализацию вирусных частиц, посредством привлечения и активации нейтрофилов способствовать уничтожению клеток, подвергшихся заражению вирусом [Bakema & van Egmond, 2011]. Перечисленные свойства обуславливают значительный интерес к иммуноглобулинам данного класса как к потенциальным компонентам средств профилактики и лечения вирусных заболеваний.

Пассивная иммунотерапия с использованием антител к компонентам вирусного капсида является перспективным направлением разработки новых лекарственных средств для борьбы с гриппом [Gerhard, 2001, Lachmann, 2012]. Особое значение данный подход приобретает в связи с высокой изменчивостью поверхностных антигенов вируса гриппа А (ВГА), приводящей к уменьшению эффективности применяемых вакцин и низкомолекулярных терапевтических средств. С целью создания универсальных препаратов широкой специфичности на протяжении последних лет ведется активный поиск нейтрализующих моноклональных антител, проявляющих кросс-реактивность в отношении различных серотипов ВГА. Наибольший успех в данном направлении был достигнут в результате масштабного скрининга более 100 тыс. отдельных культивированных антителопродуцирующих В-клеток нескольких доноров, у которых наблюдали значительную гетеротипичность иммунного ответа в отношении ряда подтипов ВГА [Corti *et. al.*, 2011]. Было найдено уникальное антитело F16, обладающее способностью связывать рекомбинантные и природные гемагглютинины 1-й и 2-й филогенетических групп. Широкая специфичность данного антитела, по-видимому, обусловлена тем, что оно взаимодействует с консервативным эпитопом в F субдомене гемагглютинина, менее подверженном мутагенезу, чем домен HA1 гемагглютинина. 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 данного универсального антитела открывает широкие возможности для создания на его основе различных рекомбинантных вариантов иммуноглобулинов.

Дыхательные пути являются основным способом проникновения ВГА в организм, поэтому интраназальное введение нейтрализующих антител может значительно способствовать повышению эффективности пассивной иммунотерапии [Tamura и Kurata, 2004]. При данной форме введения препаратов значительный профилактический эффект может быть достигнут при использовании рекомбинантного иммуноглобулина А, обладающего вируснейтрализующими свойствами. При этом препараты на основе рекомбинантных антител человека должны обладать минимумом побочных эффектов по сравнению с низкомолекулярными фармацевтическими препаратами и могут быть рекомендованы широкому кругу пациентов.

В отличие от антител класса G, занимающих значительную долю фармацевтического рынка, рекомбинантные иммуноглобулины класса А пока не заняли свою нишу в арсенале терапевтических препаратов. Во-многом, это обусловлено более сложной молекулярной структурой данного класса иммуноглобулинов по сравнению с антителами класса G, а также недостаточно высоким уровнем их продукции в гетерологичных системах экспрессии.

В связи с этим разработка и оптимизация способов получения рекомбинантных иммуноглобулинов класса А в эукариотических системах экспрессии является актуальной задачей современной биотехнологии.

**Цель и задачи исследования.** Целью выполнения работы являлось получение рекомбинантных аналогов антитела к гемагглютнину вируса гриппа А в формате иммуноглобулина А и исследование их биологических свойств в сравнении с антителом IgG1-изотипа. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- разработка способов получения мономерных и димерных форм иммуноглобулина А в клетках яичников китайского хомячка СНО;
- получение в формате иммуноглобулина А рекомбинантных аналогов антитела FI6, широкоспецифичного к гемагглютинином 16 подтипов ВГА;
- исследование взаимодействия мономерных и димерных форм антитела IgA1- и IgA2m1-изотипов с различными подтипами ВГА;
- анализ вируснейтрализующей активности рекомбинантных антител *in vitro* и на летальной модели гриппозной пневмонии у мышей при интраназальном применении.

**Научная новизна.** Впервые осуществлено получение в формате иммуноглобулина А рекомбинантных аналогов человеческого антитела FI6, широкоспецифичного к гемагглютинином вируса гриппа А. На основе бипромоторного (CMV, hEF1-HTLV) вектора

получены генетические конструкции для экспрессии тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов IgA1-, IgA2m1- и IgG1-изотипов. В результате трансфекции и селекции клеток яичников китайского хомячка CHO получены клеточные линии, стабильно экспрессирующие мономерные и димерные формы иммуноглобулина А IgA1- и IgA2m1-изотипов, а также контрольного антитела IgG1-изотипа. Осуществлено выделение рекомбинантных иммуноглобулинов из культуральной жидкости, проведена иммунохимическая характеристика антител и исследовано взаимодействие полученных рекомбинантных иммуноглобулинов со штаммами ВГА H1N1- и H3N2-подтипов. Впервые показано, что рекомбинантные варианты антитела F16 класса А сохраняют свойство исходного антитела проявлять специфичность в отношении всех исследуемых штаммов. При этом наибольший уровень связывания достигается для подтипа H1N1, относящегося к гемагглютинином I филогенетической группы.

Впервые показано, что при интраназальном применении у мышей, летально инфицированных штаммами гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/California/07/09 (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68 (H3N2), рекомбинантная димерная форма иммуноглобулина IgA1-изотипа способна обеспечить протективный эффект, сопоставимый с действием препарата осельтамивир (Тамифлю).

**Практическая значимость работы.** Разработаны способы получения функционально-активных мономерных и димерных форм рекомбинантного иммуноглобулина класса А в клеточных линиях CHO. Данные методы могут быть использованы для получения рекомбинантных IgA различной антигенной специфичности, что может послужить основой для разработки новых средств иммунотерапии на основе рекомбинантных иммуноглобулинов класса А.

На основе антитела F16, обладающего широкой специфичностью в отношении различных подтипов ВГА, получены рекомбинантные аналоги в формате иммуноглобулина А. Димеры IgA1-изотипа могут составить основу новых средств мукозальной профилактики заболевания гриппом.

**Апробация работы.** Основные результаты работы представлены на 7-й Конференции PEGS по инженерии белков и антител (The 7th PEGS Europe Protein & Antibody Engineering Summit, Лиссабон, Португалия, 2015), V Съезде Биохимиков России (Сочи, Россия, 2016), Фестивале науки (Москва, Россия, 2016), международной конференции «Тенденции в исследовании гриппа 2017» (Trends in Influenza Research, Санкт-Петербург, Россия, 2017).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 9 работ, из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ 02.08 по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) (хим. науки), и 4 тезисов в сборниках материалов российских и международных конференций.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (главы 1-2), экспериментальной части (глава 3), описывающей материалы и методы исследования, результатов и обсуждения (главы 4-8), выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 109 страницах, содержит 10 таблиц и 29 рисунков. Список литературы включает 114 ссылок.

### **Используемые сокращения**

ВГА – вирус гриппа А; ДГФР – дигидрофолатредуктаза; ИФА – иммуноферментный анализ

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ**

### **1. Разработка системы экспрессии и получение мономерных и димерных форм иммуноглобулина А, специфичных к гемагглютнину вируса гриппа А**

Целью данного этапа работы являлось получение экспрессионных генетических конструкций, кодирующих мономерные и димерные формы широкоспецифического антитела FI6 IgA1- и IgA2-изотипов. В качестве контрольного образца также предстояло получить антитело FI6 IgG1-изотипа.

У человека иммуноглобулин А присутствует в двух изотипах - IgA1 и IgA2. IgA1 превалирует в сыворотке, в то время как в секреторных выделениях выше процентная доля IgA2 [Delacroix *et al.*, 1982]. Наибольшие структурные отличия между данными изотипами антител наблюдаются в шарнирном участке. Последовательность шарнирного участка IgA1 на 13 а.о. протяженнее, чем у IgA2. Вследствие этого антитела IgA1-изотипа обладают большей подвижностью антиген-связывающих участков. Данное преимущество IgA1 сопряжено с большей по сравнению с IgA2 уязвимостью к протеолизу в области шарнирных участков [Bakema & van Egmond, 2011]. Антитело IgA2-изотипа встречается в виде двух аллотипов: IgA2m1 и IgA2m2. Данные аллотипы различаются между собой количеством сайтов гликозилирования и, что весьма существенно, расположением межцепных дисульфидных связей [Chintalacharuvu *et al.*, 2004]. В IgA2m1 отсутствуют типичные для структуры иммуноглобулинов дисульфидные связи между константным доменом легкой и

CН1 константным доменом тяжелой цепей. При этом дисульфидная связь образуется между константными доменами легких цепей, а взаимодействие между легкой и тяжелой цепью носит нековалентный характер.

Для экспрессии рекомбинантных антител в клетках СНО был предложен бипромоторный вектор, разработанный ранее [Патент РФ № 2555533] и успешно зарекомендовавший себя при получении антител. Данный экспрессионный вектор содержит две транскрипционные единицы, рСМV и hEF1-HTLV промоторы, контролирующие транскрипцию тяжелой и легкой цепей антител в одной плазмиде. Плазида также содержит ген дигидрофолатредуктазы (ДГФР), который транслируется через независимый сайт связывания рибосом. Такой экспрессионный вектор позволяет при амплификации копий гена ДГФР в хромосоме линий-продуцентов методом селективного давления метотрексатом одновременно увеличивать копийность генов легкой и тяжелой цепей антител.

Конструирование нуклеотидных последовательностей переменных доменов антитела FI6 осуществляли химико-ферментативным синтезом с использованием метода полимеразной цепной реакции и набора олигонуклеотидных праймеров с попарно перекрывающимися концевыми частями (SOE-PCR). Олигонуклеотидные праймеры были сконструированы на основании аминокислотных последовательностей FI6VHv3 для тяжелой цепи и FI6VKv2 для легкой цепи [Corti *et al.*, 2011]. Данные последовательности представляют собой модифицированную версию исходного антитела FI6, приближенную к последовательности переменных доменов зародышевых линий иммуноглобулинов человека.

### **1.1 Конструирование бипромоторной плазмиды для экспрессии рекомбинантного антитела FI6 IgG1-изотипа**

К 5'-концевой области кДНК переменного домена тяжелой цепи антитела FI6VHv3 методом SOE-PCR присоединяли фрагмент, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерный пептид MAWVWTLFLMAAAQSAQA, и нетранслируемую регуляторную область. Для создания бипромоторной системы экспрессии полученный в результате SOE-PCR фрагмент ДНК обрабатывали рестриктазами NheI и Bsp120I и клонировали в предобработанную теми же рестриктазами плазмиду рSK+/hEF1-HTLV-BGH, содержащую гибридный промотор hEF1-HTLV, полноразмерную константную область IgG1 и сайт полиаденилирования BGH, все вместе фланкированные сайтами узнавания рестриктазы MluI. Таким образом, была получена плазида рSK+/hEF1-HTLV-FI6HG1-BGH.

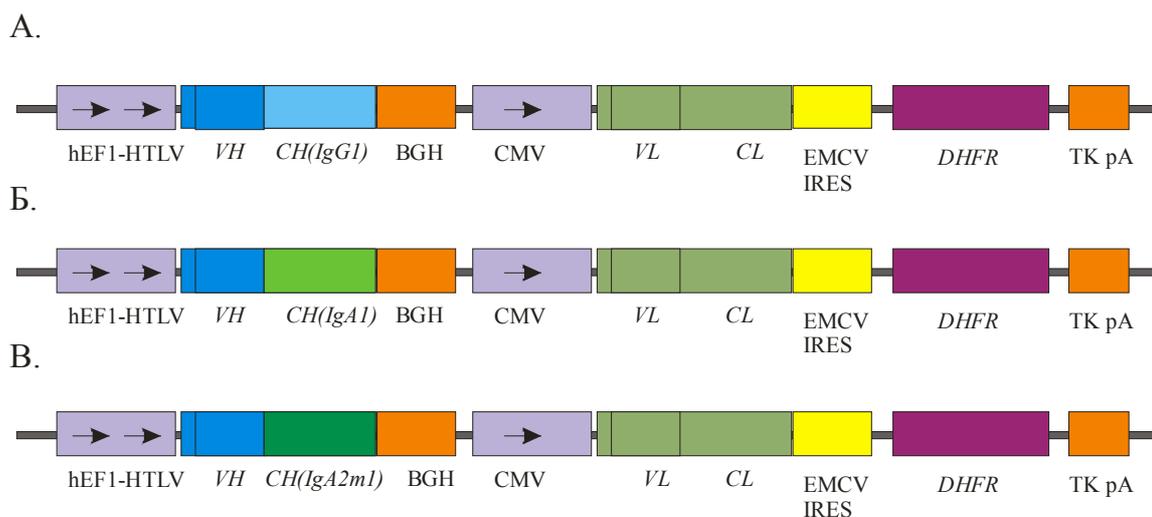
По аналогии с тяжелой цепью получали кДНК легкой цепи человека, адаптированную для экспрессии в клетках эукариот. Для этого методом SOE-PCR проводили объединение лидерного пептида MKSQTQVFVFLLLCVSGAHG, полученной кДНК варибельного домена легкой цепи антитела FI6VKv2 и кДНК константного домена каппа-изотипа человека. Полученный фрагмент ДНК обрабатывали рестриктазами NheI и Sfr274I и клонировали в предобработанную теми же рестриктазами плазмиду pOptiVEC (Invitrogen, США) с предварительно введенным рядом с 5'-концом промотора сайтом узнавания рестриктазы MluI. Таким способом была получена плазида pOpti-FI6L, содержащая ген легкой цепи антитела FI6 под контролем промотора CMV. Далее для получения плазмиды pBiPr-ABIgG1FI6 фрагмент MluI-MluI (2500 п.о.) из плазмиды pSK+/hEF1-HTLV-FI6HG1-BGH лигировали в предобработанный рестриктазой MluI и дефосфорилированный вектор pOpti-FI6L.

## **1.2 Конструирование бипромоторных плазмид для экспрессии мономерных форм рекомбинантных антител FI6 IgA1- и IgA2m1-изотипов**

Константные домены тяжелой цепи IgA1- и IgA2m1-изотипов получали следующим образом. Экзоны соответствующих генов амплифицировали с использованием хромосомной ДНК человека в качестве матрицы и специфических олигонуклеотидных праймеров и клонировали в промежуточный вектор pAL-TA (Евроген, Россия). Объединение экзонов, принадлежащих константным доменам одинаковых изотипов, проводили с помощью метода SOE-PCR. Полученные фрагменты обрабатывали рестриктазами SacI и Sfr274I, и каждый из них клонировали совместно с фрагментом NheI-SacI из pSK+/hEF1-HTLV-FI6HG1-BGH, содержащим лидерный пептид MAWVWTLLFLMAAAQSAQA и варибельную область тяжелой цепи антитела FI6, в предобработанный рестриктазами NheI и Sfr274I вектор pSK+/hEF1-HTLV-BGH. Таким образом, были получены плазмиды pSK+/hEF1-HTLV-FI6HA1-BGH и pSK+/hEF1-HTLV-FI6HA2m1-BGH, содержащие промотор hEF1-HTLV, лидерный пептид MAWVWTLLFLMAAAQSAQA, варибельную область тяжелой цепи антитела FI6, кДНК константного домена IgA1- или IgA2m1-изотипа человека (соответственно) и нетранслируемую область, включающую в себя сайт полиаденилирования BGH, фланкированные сайтами узнавания рестриктазы MluI.

На заключительном этапе получения бипромоторных плазмид pBiPr-ABIgA1FI6 и pBiPr-ABIgA2m1FI6 фрагменты MluI-MluI (2500 п.о.) из плазмид pSK+/hEF1-HTLV-FI6HA1-BGH и pSK+/hEF1-HTLV-FI6HA2m1-BGH, соответственно, лигировали в предобработанный рестриктазой MluI и дефосфорилированный вектор pOpti-FI6L.

Структура экспрессионных кассет плазмид, сконструированных для получения мономерных форм антител представлена на Рис. 1.



**Рис. 1.** Схема экспрессионных кассет бипромоторных плазмид для получения мономерных форм антител FI6 различных изотипов. А. Плазмида pBiPr-ABIgG1FI6 Б. Плазмида pBiPr-ABIgA1FI6. В. Плазмида pBiPr-ABIgA2m1FI6. hEF1-HTLV - гибридный промотор из плазмиды pMG, состоящий из промотора фактора элонгации EF-1a и 5'-нетранслируемой области вируса Т-клеточной лейкемии человека HTLV; VH – переменный домен тяжелой цепи антител; CH(IgG1), CH(IgA1), CH(IgA2m1) – константные домены тяжелой цепи иммуноглобулинов человека IgG1-, IgA1-, IgA2m1-изотипов, соответственно; BGH - сайт полиаденилирования BGH; CMV - промотор/энхансер ранних генов цитомегаловируса человека; VL – переменный домен легкой цепи антител; CL – константный домен легкой цепи антитела; EMCV IRES - внутренний сайт связывания рибосом (IRES) вируса энцефаломиокардита DHFR - ген дигидрофолатредуктазы ТК pA - сигнал полиаденилирования тимидинкиназы вируса герпеса.

### 1.3 Получение клеточных линий-продуцентов, наработка и очистка рекомбинантных изоформ иммуноглобулина А и контрольного антитела IgG1-изотипа

Клетки CHO DG44 (Invitrogen, США) трансфицировали линейаризованными плазмидами pBiPr-ABIgG1FI6, pBiPr-ABIgA1FI6 и pBiPr-ABIgA2m1FI6 с использованием реагента Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США) по стандартному протоколу. Первичную селекцию трансфектантов проводили на среде CD OptiCHO (Invitrogen, США) с добавлением 8 мМ L-глутамин (Gibco, США), 0.1% Pluronic F-68 (Gibco, США) и однократного раствора антибиотика/антимикотика (Gibco, США). Для получения стабильной клеточной линии проводили флуоресцентный скрининг и отбор клонов-продуцентов. Для этого клетки высевали на полутвердую среду CloneMedia (Molecular Devices, США) с добавлением в зависимости от изотипа получаемых рекомбинантных антител FITC-меченых антител мыши к константным доменам человеческих иммуноглобулинов G (Molecular Devices, США) или

А (ВНЦМДЛ, Россия). Далее после 14-дневного культивирования клеток проводили отбор отдельных продуцирующих клонов с использованием установки ClonePix FL (Molecular Devices, США) на основании интенсивности их флуоресценции. Для дальнейшего повышения продуктивности выбранные клоны культивировали в присутствии увеличивающихся концентраций метотрексата в диапазоне от 20 до 500 нМ.

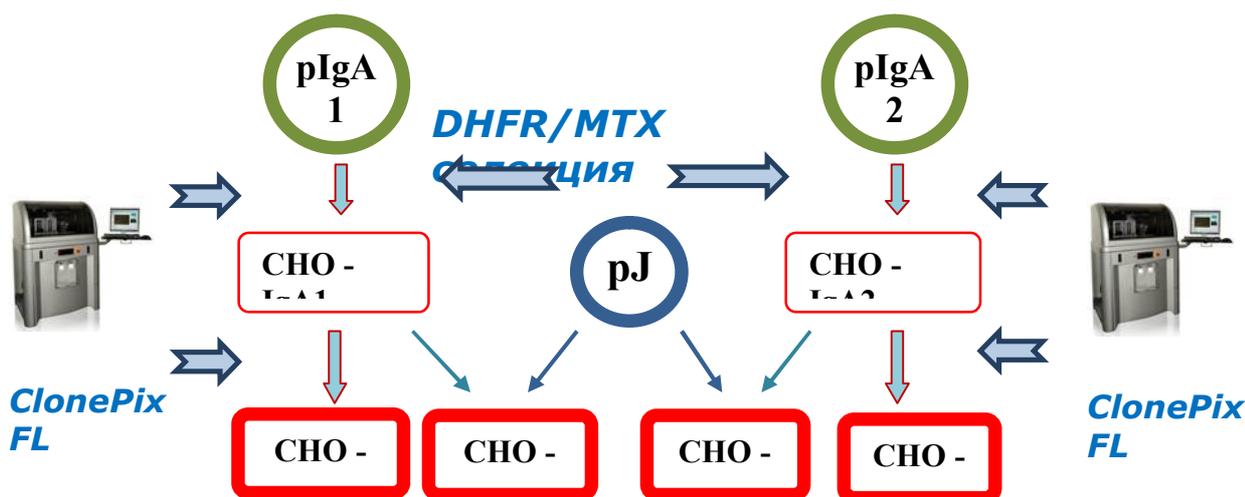
Культуру клеток, продуцирующих рекомбинантные антитела, выращивали в колбах-спиннерах с рабочим объемом 500 мл. Для этого в среду CD OptiCHO объемом 300 мл высевали  $2.5-3.0 \times 10^5$  клеток/мл и выращивали в течение 14-18 дней в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C, 8% CO<sub>2</sub> при скорости перемешивания 50-70 об/мин.

Выделение антител из культуральной жидкости проводили методом аффинной хроматографии с использованием следующих сорбентов: MabSelect SuRe для очистки антитела IgG1-изотипа и KappaSelect для очистки антител IgA1- и IgA2m1-изотипов (оба сорбента производства GE Healthcare, США).

#### **1.4 Конструирование системы экспрессии и получение димерных форм рекомбинантных антител FI6 IgA1- и IgA2m1-изотипов**

Иммуноглобулины IgA-изотипа представлены тремя изоформами: мономерами, димерами и секреторной формой. На эпителиальных покровах слизистой преобладают димерная и секреторная формы, каждая из которых представляет собой белки с молекулярным весом более 300 кДа. В димерах IgA-изотипа Fc-фрагменты 2-х мономеров соединены между собой ковалентно J-цепью. Димеры обладают широким спектром эффекторных функций иммуноглобулинов, но в отличие от секреторной формы не содержат субъединицы секреторного компонента, что несколько упрощает биотехнологический процесс их получения и очистки.

Принцип получения клеточных линий, продуцирующих димеры антитела FI6 IgA1- и IgA2m1-изотипов заключался в том, что полученные на предыдущем этапе работы клеточные линии-продуценты мономерных форм иммуноглобулинов дополнительно трансфицировались экспрессионной плазмидой pCDNA-J, содержащей ген J – цепи, соединяющей мономеры в димер, и ген устойчивости к гентамицину G418. В общем виде методология получения клеточных линий-продуцентов рекомбинантных антител схематически представлена на Рис. 2.



**Рис. 2** Схема получения клеточных линий-продуцентов мономеров и димеров рекомбинантных антител IgA1- и IgA2m1-изотипов

pIgA1 – плаزمида для экспрессии антитела IgA1-изотипа

pIgA2 – плазмида для экспрессии антитела IgA2-изотипа

pJ – плазмида для экспрессии J-цепи

CHO-IgA1 – клетки CHO, прошедшие селекцию после трансфекции pIgA1

CHO-IgA2 – клетки CHO, прошедшие селекцию после трансфекции pIgA2

CHO-IgA1 мономер – продуценты мономера антитела IgA1-изотипа

CHO-IgA1 димер – продуценты димера антитела IgA1-изотипа

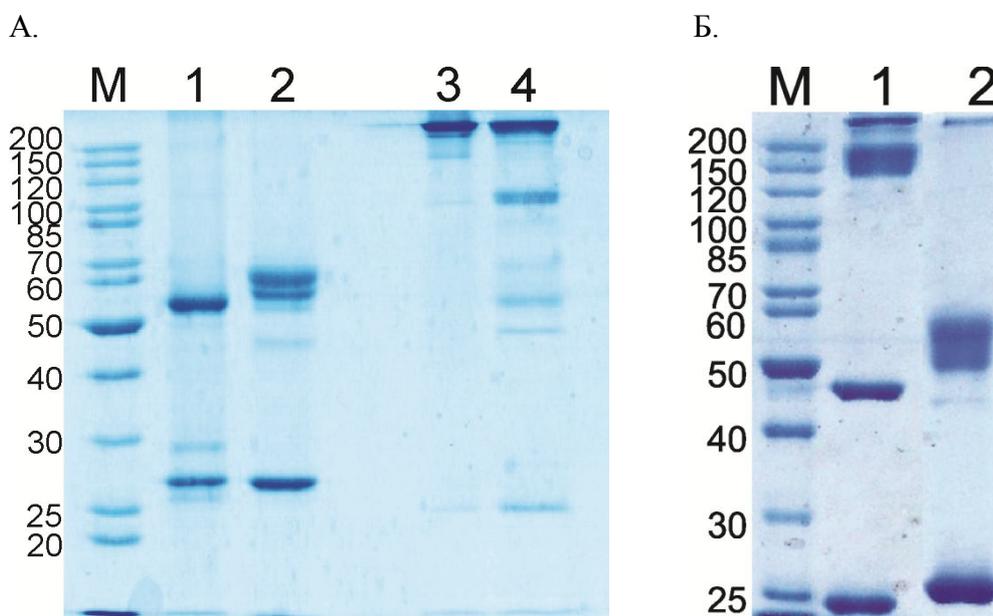
CHO-IgA2 мономер – продуценты мономера антитела IgA2-изотипа

CHO-IgA2 димер – продуценты димера антитела IgA2-изотипа

После проведения трансфекции клеточные культуры выращивали на селективной среде CD OptiCHO с добавлением антибиотика G418 для селекции клонов-продуцентов димеров антител FI6-IgA1 и FI6-IgA2m1, содержащих J-цепь. После завершения этапа селекции для выявления наиболее продуктивных клонов проведен повторный отбор с помощью прибора ClonePix с применением FITC-меченых антител против IgA человека. Выбранные клоны прошли дополнительный отбор методом лимитирующего разведения – с целью повышения их продуктивности и стабильности. Так же, как и при получении мономерных форм иммуноглобулинов класса IgA, выделение димерных форм антител из культуральной жидкости проводили методом аффинной хроматографии с использованием сорбента KappaSelect.

## 2. Исследование биохимических и иммунохимических свойств рекомбинантных изоформ иммуноглобулина А

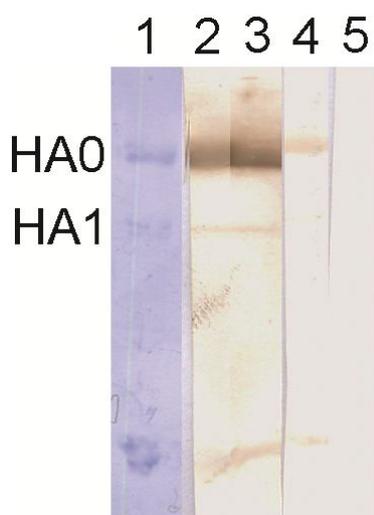
Полученные экспериментальные образцы рекомбинантных антител IgG1-изотипа и мономеров IgA1- и IgA2m1-изотипов анализировали с помощью полиакриламидного геле-электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (Рис. 3).



**Рис. 3.** Гель-электрофореграмма антител FI6 в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. А. 1, 3 – антитела IgG1; 2, 4 – антитела IgA1. 1, 2- в присутствии β-меркаптоэтанола. 3, 4 - в отсутствие β-меркаптоэтанола. Б. Антитела IgA2m1 в отсутствие (1) и в присутствии (2) β-меркаптоэтанола. М – маркеры мол. веса.

Анализ гель-электрофореграмм показывает, что размер обнаруживаемых белковых фрагментов отражает особенности расположения межцепных дисульфидных связей для каждого из исследуемых изотипов. Так, для антител IgG1- и IgA1-изотипов наблюдается появление в восстанавливающих условиях двух полос, соответствующих легкой и тяжелой цепям иммуноглобулинов. Антитело IgA2m1-изотипа демонстрирует свойственное данному изотипу уникальное расположение межцепных дисульфидных связей. Как упоминалось ранее, у антител IgA2m1-изотипа отсутствует характерная для большинства иммуноглобулинов межцепная дисульфидная связь между константным доменом легкой и C<sub>H</sub>1-доменом тяжелой цепи. При этом константные домены легких цепей соединены между собой дисульфидной связью. В невосстанавливающих условиях на гель-электрофореграмме (Рис. 3Б) присутствуют димеры легких цепей ~ 46 кДа и димеры тяжелых цепей ~ 105 кДа.

Антиген-связывающую активность полученных рекомбинантных белков исследовали методом иммуноблоттинга по отношению к инактивированному штамму гриппа A/Solomon Islands/03/06, относящегося к H1N1-подтипу (Рис. 4).



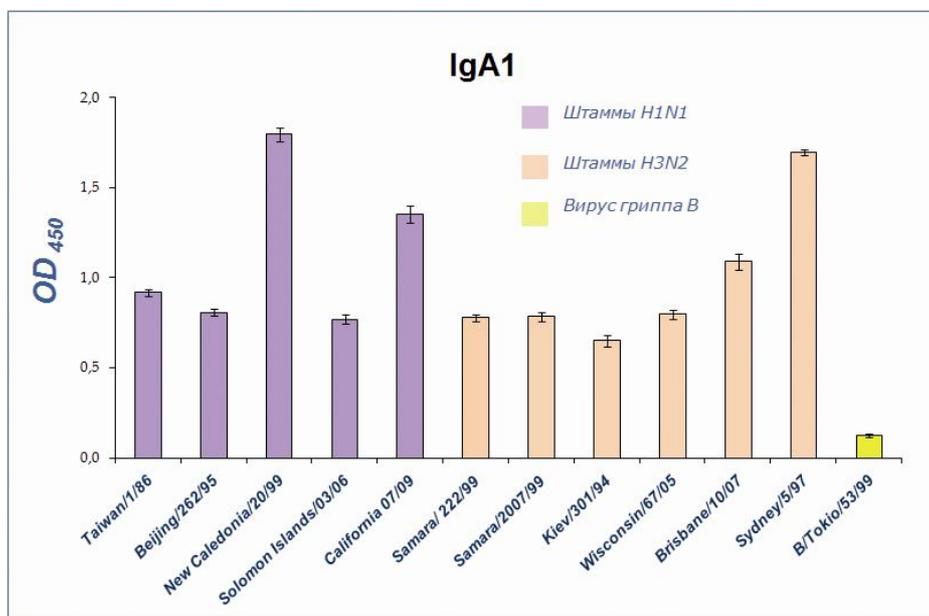
**Рис. 4.** Иммуноблот рекомбинантных антител FI6 с белками штамма ВГА A/Solomon Islands/03/06 (H1N1). 1. Результаты электрофореза белков ВГА до переноса на мембрану. 2. Иммуноблот с антителами FI6 IgG1-изотипа. 3. Иммуноблот с антителами FI6 IgA1-изотипа. 4. Иммуноблот с антителами FI6 IgA2m1-изотипа. 5. Контроль вторичного конъюгата (иммуноблот в отсутствие рекомбинантных антител)

Данные иммуноблоттинга подтверждают способность полученных рекомбинантных антител узнавать нативный гемагглютинин ВГА. При этом подтверждаются полученные ранее на примере Fab-фрагмента антитела FI6 IgG1-изотипа результаты, свидетельствующие о том, что антитело FI6 способно взаимодействовать как с цельным гемагглютинином HA0, так и с фрагментами HA1 и HA2, образующимися в результате гидролиза целого белка при проведении гелевого электрофореза в восстанавливающих условиях. Полученные результаты согласуются с данными эпитопного картирования антитела FI6, приведенными в работе [Corti *et al.*, 2011]. Широкая специфичность FI6 обусловлена тем, что оно взаимодействует с консервативным консервативным эпитопом в F субдомене гемагглютинирина, находящегося на стыке H1 и H2 доменов. При этом тяжелая цепь антитела взаимодействует с доменом H1, а легкая цепь - с альфа-спиралью из домена H2.

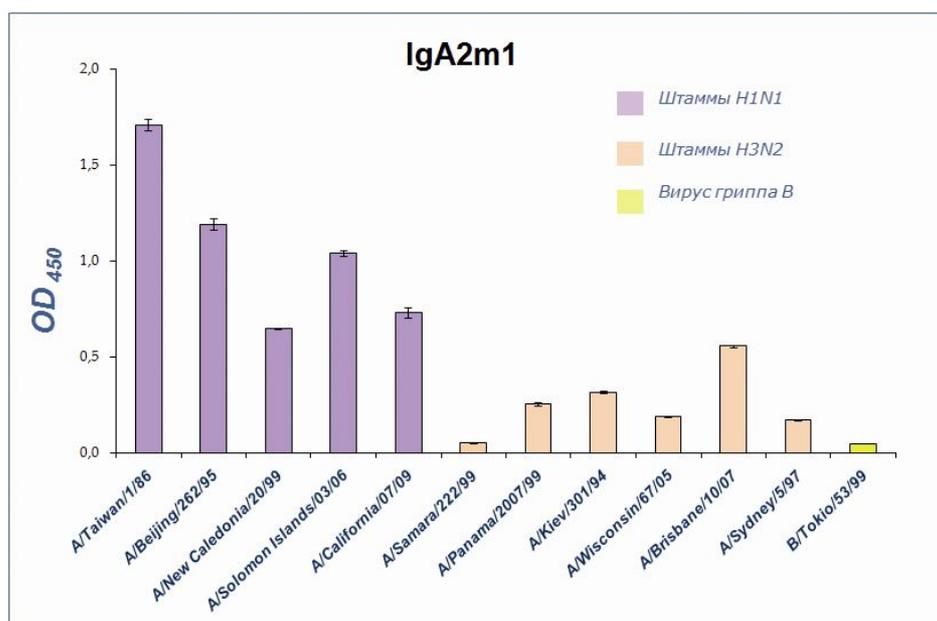
Представляло интерес исследование способности антител класса IgA взаимодействовать с различными подтипами ВГА. Сравнение антител IgA1- и IgA2m1-изотипов проводили методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием различных инактивированных штаммов ВГА H1N1 и H3N2 подтипов, иммобилизованных на твердой фазе. В качестве антигенов использовали набор высокоочищенных реликтовых и актуальных штаммов ВГА производства компании Hytest Ltd. (Турку, Финляндия) и НИИ гриппа (Санкт-Петербург, Россия). Инактивированные штаммы ВГА сорбировали в концентрации 5 мкг/мл в лунках 96-луночных планшетов с высокой связывающей способностью (Corning-Costar, Нидерланды). В качестве вторичного антитела для детекции использовали конъюгат моноклональных антител к каппа легкой цепи человека FabH A3 (ВНЦМДЛ, Россия) с пероксидазой хрена.

Проведенный иммунохимический анализ (Рис. 5 и 6) свидетельствует о том, что рекомбинантные антитела IgA1- и IgA2m1-изотипов демонстрируют способность узнавать

штаммы обоих подтипов, относящихся к различным филогенетическим группам. При этом сродство рекомбинантных антител IgA1- и IgA2m1- изотипов к некоторым штаммам исследованных подтипов отличается. Наибольшее отличие наблюдается в отношении штаммов H3N2 подтипа, интенсивность взаимодействия которых с антителами IgA2m1 – изотипа значительно ниже, чем с антителами IgA1 – изотипа.



**Рис. 5.** Непрямой ИФА взаимодействия штаммов H1N1 и H3N2 подтипов ВГА с рекомбинантными антителами FI6 IgA1 –изотипа

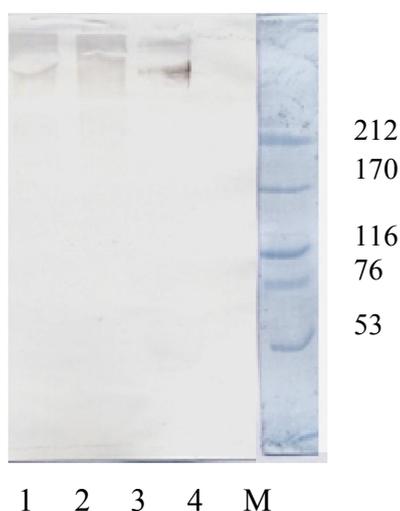


**Рис. 6.** Непрямой ИФА взаимодействия штаммов H1N1 и H3N2 подтипов ВГА с рекомбинантными антителами FI6 IgA2m1 –изотипа

Полученные результаты согласуются с данными работы [Corti *et al.*, 2011], из которых следует, что антитела FI6, обладая способностью узнавать 16 подтипов ВГА, характеризуются различной силой связывания штаммов разных подтипов.

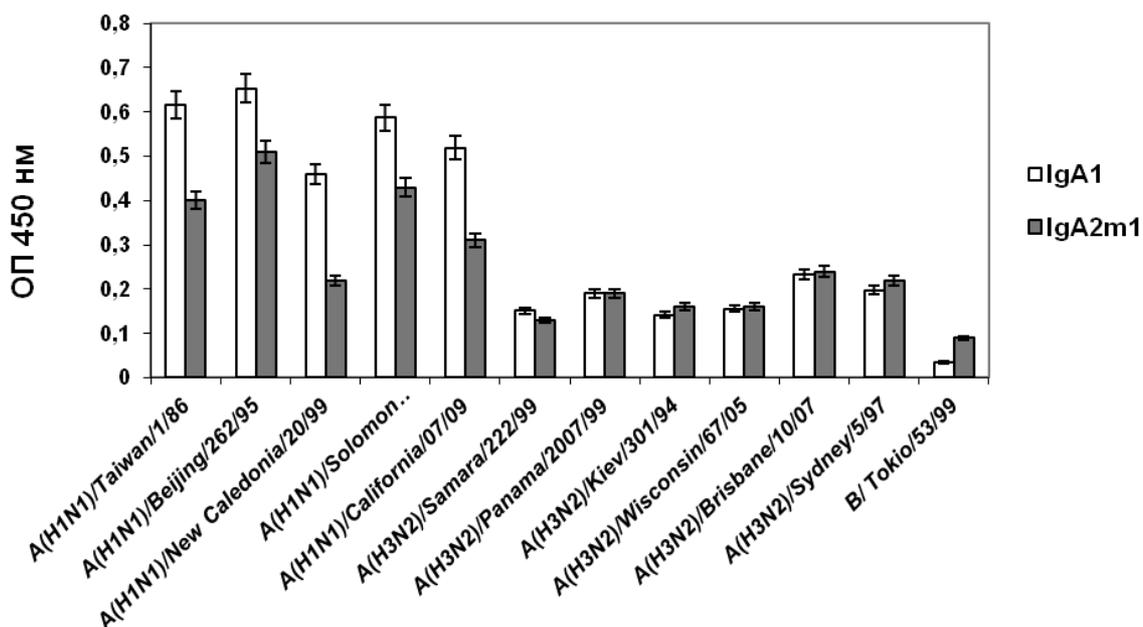
Исследования свойств димерных изоформ иммуноглобулина А проводили методами иммуноблоттинга и непрямого ИФА.

На Рис. 7 представлены результаты иммуноблоттинга образцов димеров иммуноглобулина FI6 IgA1- и IgA2m1-изотипов. Для детекции использован конъюгат с пероксидазой хрена мышинных антител к J-цепи (Sigma, США). Данные иммуноблоттинга подтверждают наличие J-цепи и образование димеров IgA1- и IgA2m1-изотипов с молекулярным весом более 300 кДа.



**Рис. 7.** Иммуноблот образцов димеров IgA. 1 – димер IgA1-изотипа; 2- димер IgA2m1-изотипа; 3 – образец IgA из слюны человека; 4 - мономер IgA2m1-изотипа (отрицательный контроль); М – маркеры молекулярного веса, кДа.

Методом непрямого ИФА было исследовано взаимодействие полученных рекомбинантных димерных форм иммуноглобулинов IgA1- и IgA2m1-изотипов к различным штаммам ВГА H1N1 и H3N2. На Рис. 8 приведены значения ОП<sub>450</sub> при концентрации антигена 0.1 мкг/мл.



**Рис. 8.** Непрямой ИФА димеров IgA1- и IgA2m1-изотипов со штаммами ВГА H1N1 и H3N2 подтипов

В Табл. 1 представлены средние значения оптической плотности при 450 нм после проведения ИФА мономерных и димерных форм иммуноглобулинов со штаммами гриппа A(H1N1)/ Solomon Islands/03/06 и A(H3N2)/Brisbane/10/07, относящимся к I и II филогенетическим группам гемагглютининов, соответственно.

**Таблица 1.** Непрямой ИФА мономеров и димеров IgA со штаммами вируса гриппа A A(H1N1)/ Solomon Islands/03/06 и A(H3N2)/ Brisbane/10/07

Антиген мкг/мл	A(H1N1)/ Solomon Islands/03/06					A(H3N2)/ Brisbane/10/07				
	IgG1	IgA1	IgA1d	IgA2	IgA2d	IgG1	IgA1	IgA1d	IgA2	IgA2d
3	3.31	3.57	3.36	2.96	3.19	3.42	3.36	3.16	0.81	1.85
1	3.35	3.43	3.34	1.05	3.40	3.10	3.27	3.27	0.31	0.76
0.3	3.05	3.31	3.35	0.26	1.95	2.45	3.21	3.15	0.21	0.32
0.1	1.35	3.27	2.57	0.17	0.32	1.12	3.01	2.38	0.17	0.21
0.03	0.50	1.57	0.95	0.11	0.12	0.38	1.72	1.14	0.15	0.19
0.01	0.22	0.59	0.36	0.10	0.09	0.17	0.71	0.43	0.14	0.17
0.003	0.15	0.28	0.19	0.09	0.09	0.12	0.28	0.20	0.12	0.15

IgG1 – иммуноглобулин FI6 IgG1-изотипа;  
 IgA1 – мономер иммуноглобулина FI6 IgA1-изотипа;  
 IgA1d – димер иммуноглобулина FI6 IgA1-изотипа;  
 IgA2 – мономер иммуноглобулина FI6 IgA2m1-изотипа;  
 IgA2d – димер иммуноглобулина FI6 IgA2m1-изотипа

Из данных ИФА следует, что полученные димеры IgA обладают высокой антигенсвязывающей активностью. Иммуноглобулины IgA1-изотипа (как мономеры, так и димеры) демонстрируют более высокую антигенсвязывающую активность по сравнению с антителами IgA2m1-изотипа. Уровень связывания с вирусными частицами для димеров IgA даже несколько выше, чем для исходных антител IgG1-изотипа, что, возможно, обосновано тетравалентным характером взаимодействия и, как следствие, большей avidностью.

Константы диссоциации комплекса антиген-антитело для мономеров и димеров IgA1- и IgA2m1-изотипов определяли методом конкурентного ИФА по методу Фриге в координатах Клотца [Friguet *et al.*, 1985]. В качестве антигена использован штамм ВГА A(H1N1)/ Solomon Islands/03/06. Полученные значения приведены в Таблице 2.

**Таблица 2.** Сравнение Kd для рекомбинантных антител FI6 IgG- и IgA- изотипов

Антитело	Kd, нМ
IgG1	1.2 – 1.8
Мономер IgA1	0.7 - 1.5
Мономер IgA2m1	3.3 – 3.9
Димер IgA1	0.8 - 1.2
Димер IgA2m1	1.8 – 2.4

Проведенные исследования показали, что мономеры и димеры класса IgA экспрессируются в клетках СНО в функциональном виде. Полученные антитела обладают высокой аффинностью, взаимодействуют с подтипами ВГА I и II филогенетических групп. Таким образом, при переходе от изотипа IgG1 к изотипам IgA1 и IgA2m1 не произошло изменений иммунохимических свойств антитела FI6.

### **3. Исследование биологической активности рекомбинантного димера иммуноглобулина IgA1-изотипа в экспериментах *in vitro* и на мышинной модели гриппозной пневмонии**

Для исследования биологической активности была выбрана димерная форма иммуноглобулина IgA1-изотипа. Данное решение обусловлено тем, что, как показано в настоящей работе, антитела IgA1-изотипа обладают более высокой антигенсвязывающей

активностью по сравнению с антителами IgA2m1-изотипа. При этом выбор димерной формы обусловлен более высоким уровнем продукции клеточной линии, продуцирующей димерную форму антитела, по сравнению с мономерной, а также тем, что именно димерная форма антител наряду с секреторной, в основном, присутствуют на поверхности слизистой.

Противовирусную активность рекомбинантных антител оценивали по их способности ингибировать репликацию вируса гриппа в клетках MDCK. Исследуемые образцы антител разводили до концентраций 0.1–100 мкг/мл в поддерживающей среде и в объеме 100 мкл вносили в лунки 96-луночных планшетов с монослоем клеток MDCK, инкубировали в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение 1 ч, после чего в каждую лунку вносили 100 мкл поддерживающей среды, содержащей вирус в стандартной концентрации, и инкубировали планшеты в течение 48 ч в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

Содержание вируса в каждой лунке определяли в реакции гемагглютинации (РГА) с 0.5%-ной суспензией куриных эритроцитов, титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в десятичных логарифмах 50%-ной тканевой инфекционной дозы (lg TCID<sub>50</sub>).

Противовирусную активность антител оценивали по снижению инфекционной активности вируса в лунках, содержащих антитела, по сравнению с контрольными лунками (без антител) (Таблица 3). Все пробы анализировали в двух параллелях.

**Таблица 3.** Противовирусная активность антител FI6-IgG1 и димера FI6-IgA1 как ингибиторов репликации различных подтипов вируса гриппа в культуре клеток MDCK

Образец антител	Вирус	IgTCID <sub>50</sub> /0.2 мл* при концентрации антител в культуральной среде, мкг/мл								IC <sub>50</sub> , мкг/мл
		0	0.1	0.3	1.0	3.0	10.0	30.0	100.0	
FI6-IgG1	A/California/07/09 (H1N1)pdm09	6.5	5.5	5.5	4.5	< 2.5	< 2.5	H/T**	H/T**	<b>0.25</b>
	A/Aichi/2/68 (H3N2)	7.0	H/T**	H/T**	H/T**	6.0	6.0	6.0	6.0	100
	A/PuertoRico/8/34 (H1N1)	6.0	5.0	4.0	2.5	< 2.5	< 2.5	< 2.5	< 2.5	<b>0.1</b>
	A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	6.0	4.5	4.0	2.5	< 2.5	< 2.5	H/T**	H/T**	< <b>0.1</b>
	A/Anhui/1/13 (H7N9)	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	H/T**	H/T**	> 100
	B/Malaysia/2506/04	7.5	H/T**	H/T**	H/T**	7.5	7.5	7.5	7.5	> 100
Димер FI6-IgA1	A/California/07/09 (H1N1)pdm09	6.5	6.0	6.5	5.5	4.5	< 2.5	H/T**	H/T**	<b>0.5</b>
	A/Aichi/2/68 (H3N2)	6.5	H/T**	H/T**	H/T**	6.0	6.0	5.5	6.0	> 100
	A/PuertoRico/8/34 (H1N1)	6.0	4.5	4.0	2.5	< 2.5	< 2.5	< 2.5	< 2.5	< <b>0.1</b>
	A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	6.0	6.0	5.0	5.0	4.0	< 2.5	H/T**	H/T**	<b>0.5</b>
	A/Anhui/1/13 (H7N9)	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	H/T**	H/T**	> 100
	B/Malaysia/2506/04	7.5	H/T**	H/T**	H/T**	7.5	7.0	7.5	7.5	> 100
Инфликсимаб	A/PuertoRico/8/34 (H1N1)	5.5	H/T**	H/T**	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	> 100

\*Меньшему значению инфекционной активности соответствует меньшее количество вируса, измеряемого в IgTCID<sub>50</sub>

\*\*H/T – не тестировали.

Как следует из данных, представленных в таблице 3, антитела FI6-IgG1 и димеры FI6-IgA1 ингибировали репликацию различных штаммов вируса гриппа в разной степени. Наиболее чувствительными к антителам оказались вирусы гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09, A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) и A/PuertoRico/8/34 (H1N1). Значения  $IC_{50}$  для антител FI6-IgG1 в отношении этих штаммов соответствовали 0.25, 0.1 и 0.1 мкг/мл. Для димеров FI6-IgA1 значения  $IC_{50}$  были практически такими же: 0.5, 0.1 и 0.5 мкг/мл. В то же время вирусы гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Anhui/1/13 (H7N9) и B/Malaysia/2506/04 оказались практически нечувствительными к действию антител. Значения  $IC_{50}$  для антител FI6-IgG1 и FI6-IgA1 составили 100 мкг/мл. Антитела к фактору некроза опухолей-альфа IgG1-изотипа (инфликсимаб), используемые в качестве отрицательного контроля, не проявили активности в отношении ни одного из используемых штаммов вируса гриппа.

При исследовании биологической активности *in vivo* оценивали профилактический эффект (за 1 ч до инфицирования) интраназального введения димеров FI6-IgA1 на мышинных моделях гриппозной пневмонии, вызываемой введением 50-кратной летальной дозы вируса. В качестве контроля использовали метод внутрибрюшинного введения исследуемых образцов в профилактическом и лечебном режимах. Антитела вводили однократно в дозе 1 мг/кг/сутки.

Антитела IgA1-изотипа сравнивали с антителами FI6-IgG1, обладающими идентичной структурой вариабельных доменов. В качестве контролей использовали осельтамивир (препарат Тамифлю) и антитело инфликсимаб (IFM) к фактору некроза опухолей-альфа.

Исследование проводили на штаммах вируса, принадлежащих к разным филогенетическим группам: A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), пандемического штамма A/California/07/09 (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68 (H3N2).

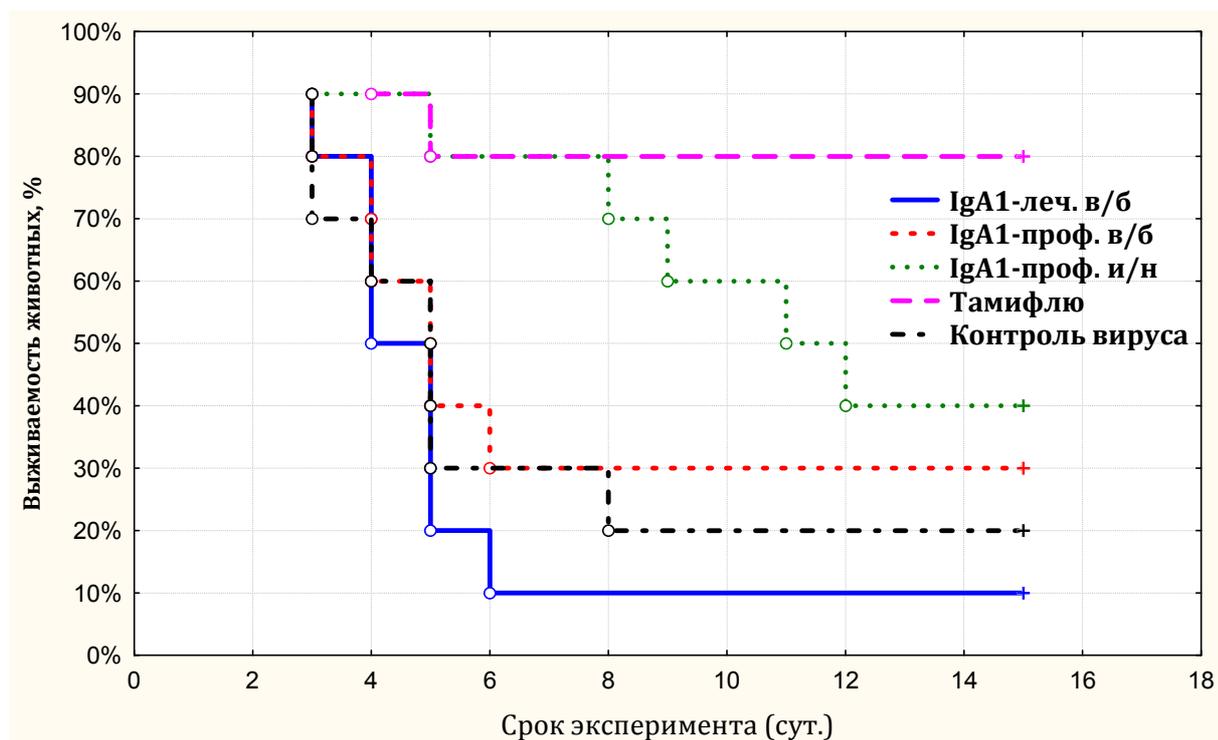
Инфицирование перечисленными вирусами гриппа приводило к развитию у животных патологического процесса. Внешние признаки заболевания проявлялись в ограничении подвижности животных, учащении и поверхностности дыхания, а также снижении потребления корма и воды, приводящем к потере веса и гибели животных. Перечисленные признаки являются типичными для гриппозной пневмонии.

Оценка влияния интраназального введения исследуемых антител на вес животных, зараженных штаммами ВГА, не выявила явной закономерности.

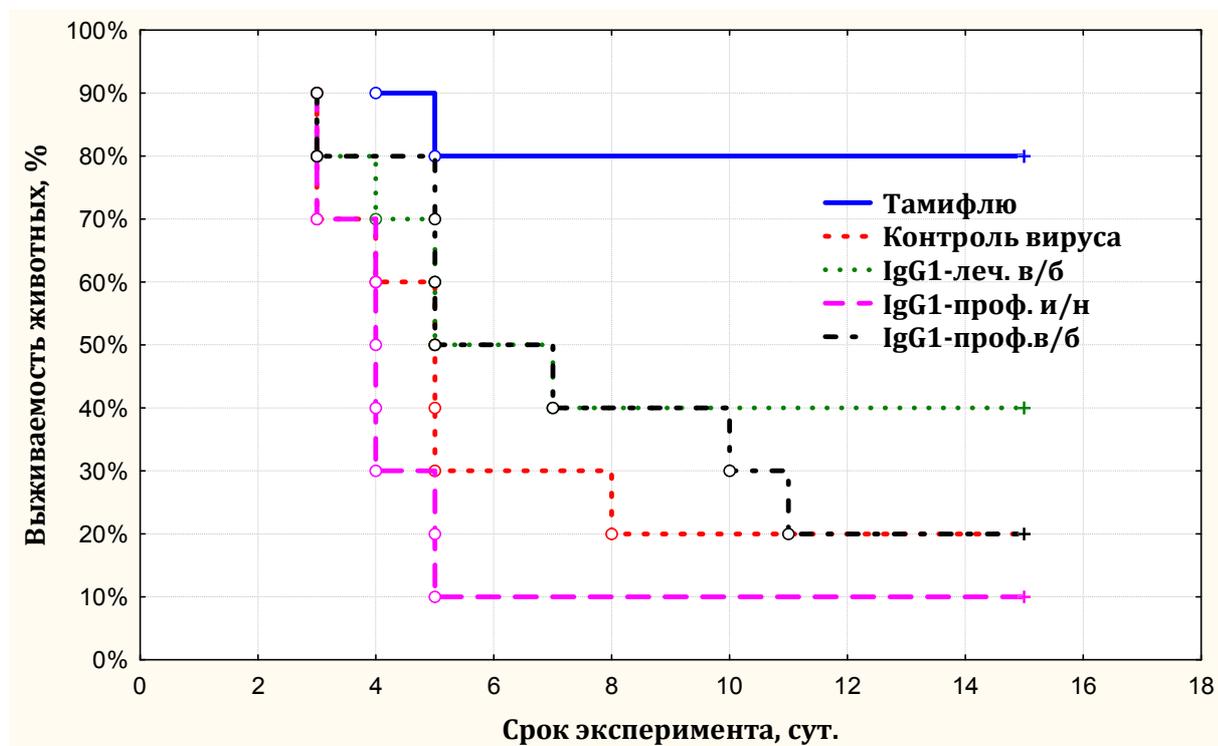
Более значимые результаты были получены при исследовании эффекта интраназального введения антител на динамику гибели животных.

Было показано, что интраназальное введение антител IgA1-изотипа наиболее эффективно в сравнении с другими антителами и другими формами введения у мышей, зараженных A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (Рис. 9-11). При этом до 7-го дня включительно после

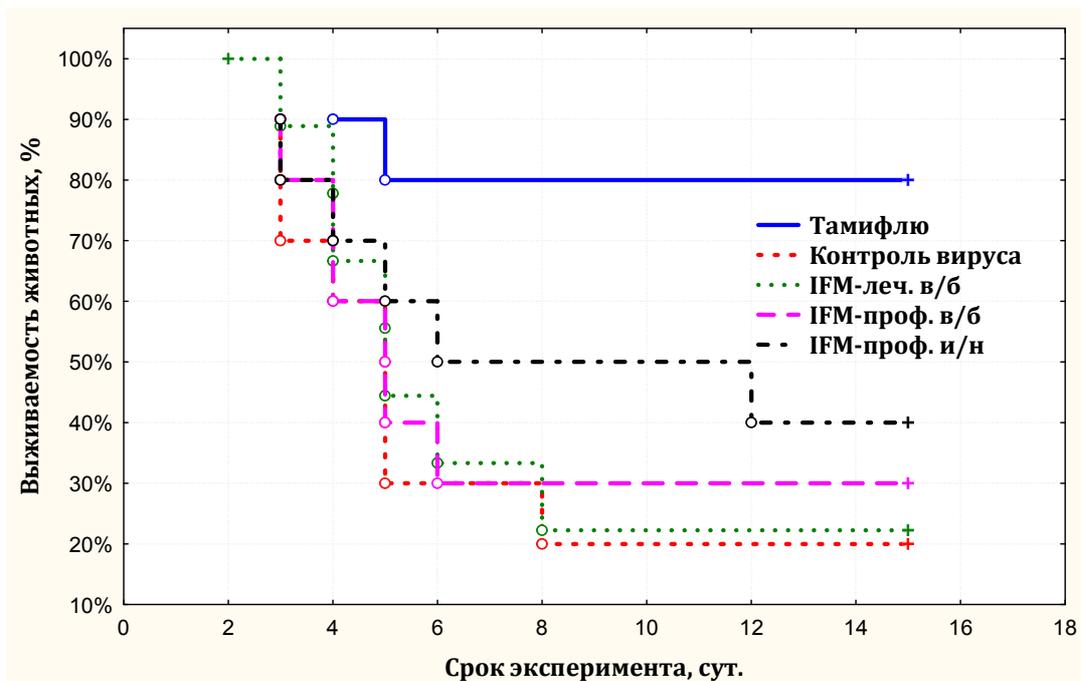
заражения выживаемость животных, получивших интраназальную профилактику, идентична контрольному препарату Тамифлю.



**Рис. 9.** Динамика гибели животных в ходе экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в условиях применения димеров IgA1. В/б-внутрибрюшинное введение; и/н –интраназальное введение; леч. – лечебный режим; проф.-профилактический режим

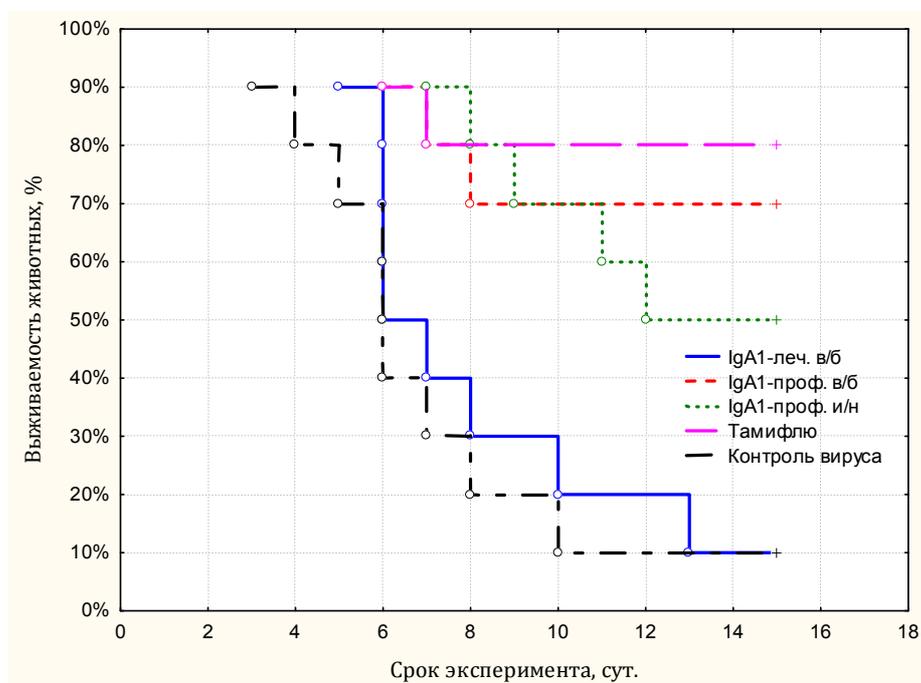


**Рис. 10.** Динамика гибели животных в ходе экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в условиях применения антител IgG1. В/б-внутрибрюшинное введение; и/н –интраназальное введение; леч. – лечебный режим; проф.-профилактический режим

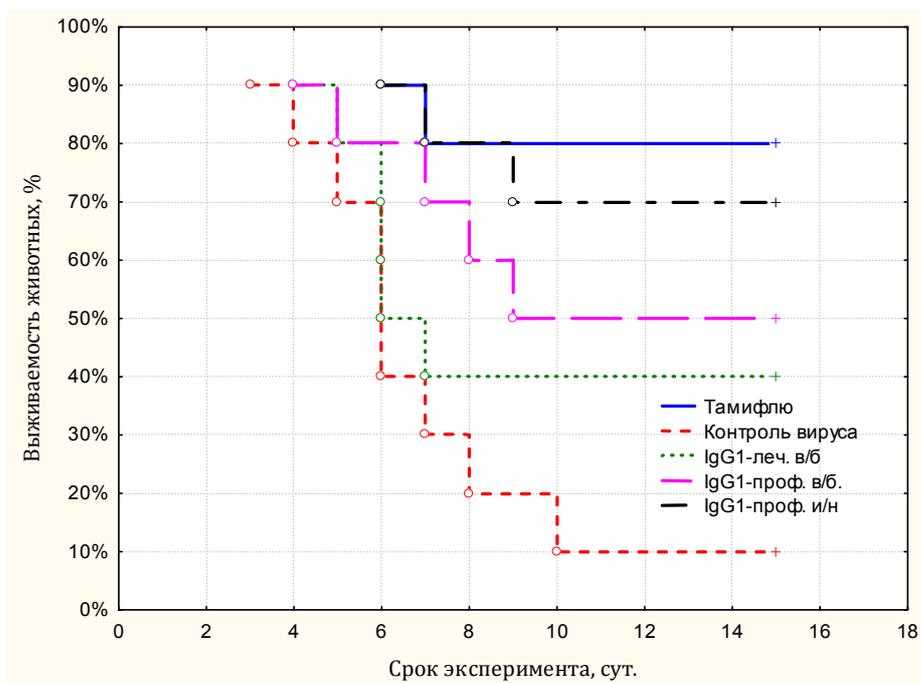


**Рис. 11.** Динамика гибели животных в ходе экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в условиях применения инфликсимаба. В/б-внутрибрюшинное введение; и/н –интраназальное введение; леч. – лечебный режим; проф.-профилактический режим

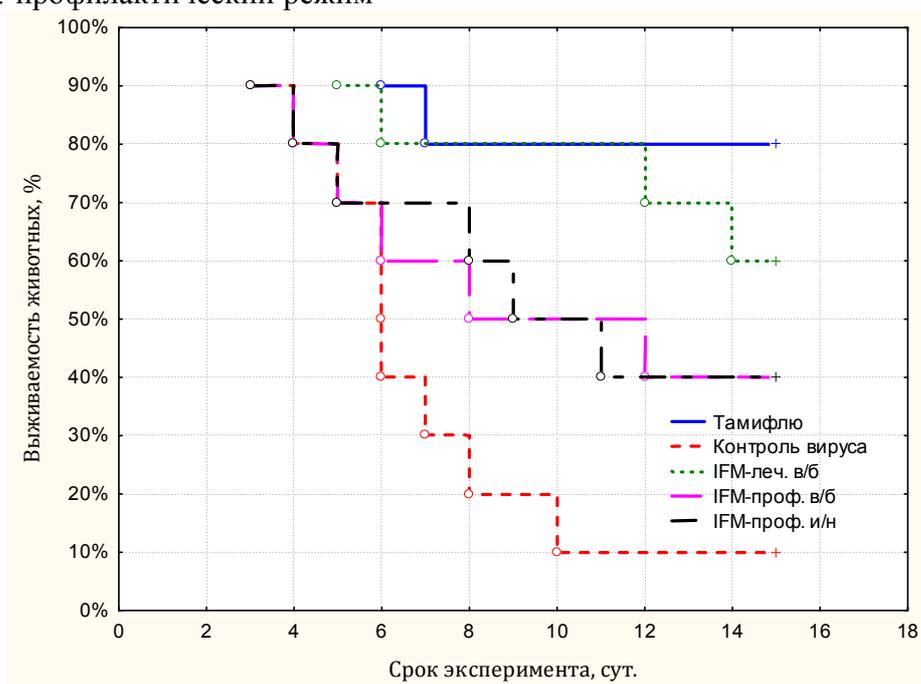
У мышей, зараженных A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/California/07/09 (H1N1)pdm09 наблюдается похожая зависимость (Рис. 12-17).



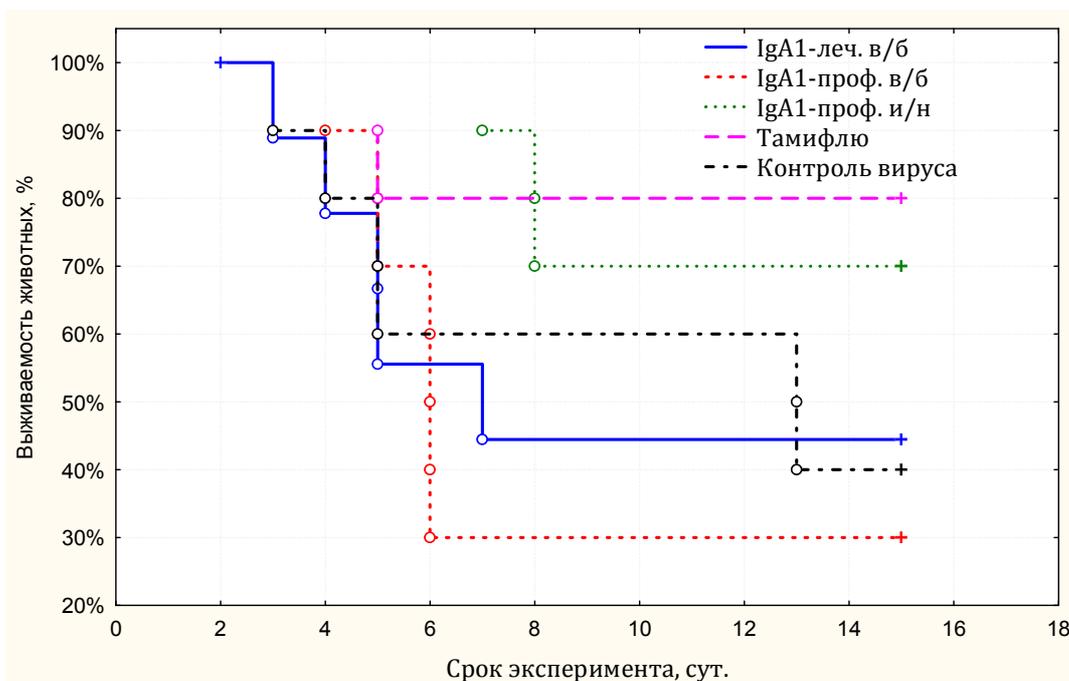
**Рис. 12.** Динамика гибели животных в ходе экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в условиях применения димера IgA1. В/б-внутрибрюшинное введение; и/н –интраназальное введение; леч. – лечебный режим; проф.-профилактический режим



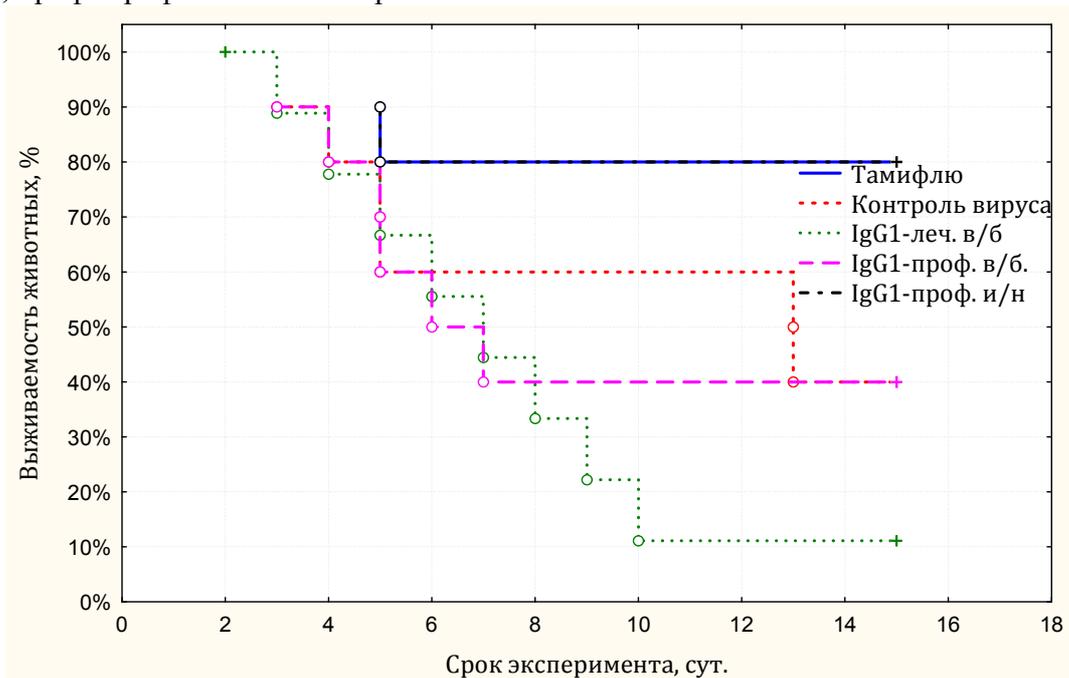
**Рис. 13.** Динамика гибели животных в ходе экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в условиях применения антител IgG1. В/б-внутрибрюшинное введение; и/н –интраназальное введение; леч. – лечебный режим; проф.-профилактический режим



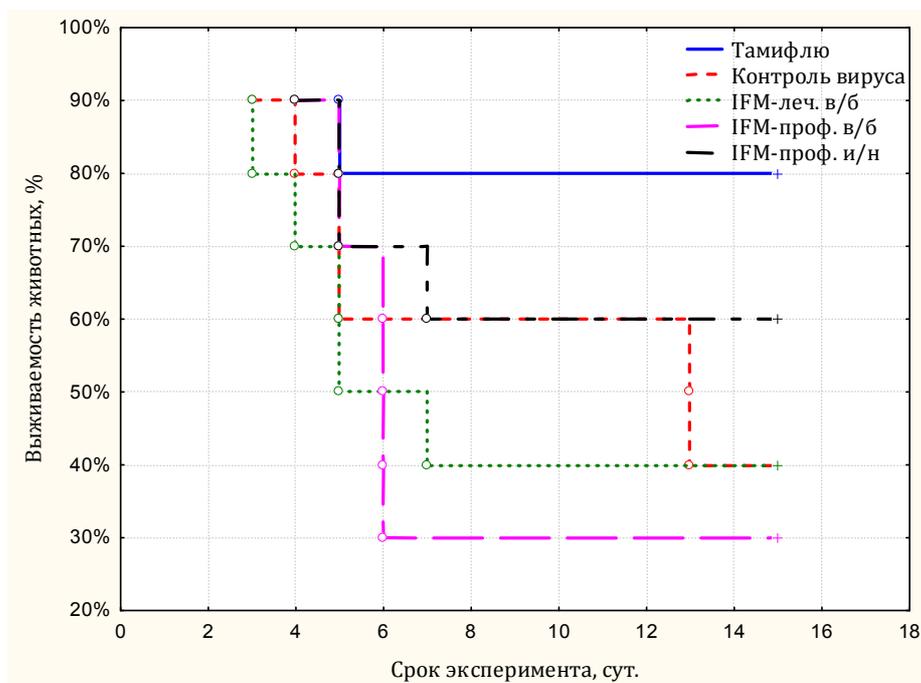
**Рис. 14.** Динамика гибели животных в ходе экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в условиях применения инфликсимаба. В/б-внутрибрюшинное введение; и/н – интраназальное введение; леч. – лечебный режим; проф.-профилактический режим



**Рис. 15.** Динамика гибели животных в ходе экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в условиях применения димеров IgA1. В/б-внутрибрюшинное введение; и/н – интраназальное введение; леч. – лечебный режим; проф.-профилактический режим



**Рис. 16.** Динамика гибели животных в ходе экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в условиях применения антител IgG1. В/б-внутрибрюшинное введение; и/н – интраназальное введение; леч. – лечебный режим; проф.-профилактический режим



**Рис. 17.** Динамика гибели животных в ходе экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в условиях применения инфликсимаба. В/б-внутрибрюшинное введение; и/н – интраназальное введение; леч. – лечебный режим; проф.-профилактический режим

Из полученных результатов следует, что на 8-й день после заражения количество выживших мышей после интраназального введения антител IgA1-изотипа составляет около 80%, что в целом соответствует показателю выживаемости для Тамифлю. На 9-й день выживаемость уменьшается и начинает уступать препарату Тамифлю по протективному эффекту, что, по-видимому, вызвано клиренсом препарата с поверхности мукозального эпителия.

Проведенные эксперименты подтвердили эффективность профилактики заболевания гриппом у мышей при интраназальном введении димеров FI6-IgA1. Уменьшение протективного эффекта со временем, начиная с 8-9 дня после введения, вероятно, может быть скорректировано посредством повторного введения вируснейтрализующих антител.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны способы получения рекомбинантных иммуноглобулинов класса А в клеточных линиях млекопитающих. На основе бипромоторного вектора получены генетические конструкции для экспрессии мономерных и димерных форм иммуноглобулинов А1- и А2m1-изотипов, а также контрольного антитела IgG1-изотипа, специфичных к гемагглютнину вируса гриппа А.
2. Созданы клеточные линии СНО - продуценты мономерных и димерных форм рекомбинантных антител IgA1-, IgA2m1- и IgG1-изотипов. Проведены наработка и очистка экспериментальных образцов рекомбинантных антител.
3. Электрофоретическая подвижность рекомбинантных антител IgA1-, IgA2m1-изотипов в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях соответствует молекулярной структуре. По данным иммуноблоттинга профиль взаимодействия данных антител с фрагментами гемагглютнина не отличается от родительского антитела FI6 IgG1-изотипа.
4. Проведенный иммунохимический анализ рекомбинантных антител на 10 штаммах ВГА подтипов H1N1 и H3N2 свидетельствует о том, что рекомбинантные антитела IgA1 – и IgA2m1 - изотипов взаимодействуют со штаммами обоих подтипов, относящихся к различным филогенетическим группам. Мономерные и димерные формы рекомбинантных антител класса IgA обладают высокой аффинностью, константы диссоциации комплекса антиген-антитело находятся в диапазоне 0.7 – 3.9 нМ.
5. Противовирусная активность димера IgA1-изотипа, исследованная *in vitro* на клетках MDCK, эффективнее проявляется на штаммах H1N1 и H5N2-подтипов вируса гриппа А.
6. На мышинной модели гриппозной пневмонии показано, что однократное интраназальное введение димеров IgA1-изотипа в дозе 1 мг/мышь в профилактическом режиме до 7-го дня включительно обеспечивает выживаемость мышей, инфицированных вирусами A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/California/07/09 (H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/68 (H3N2), сопоставимую с использованием препарата осельтамивир.

## СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI

1. **Т.К. Алиев**, И.Г. Дементьева, В.А. Топорова, М.Н. Боков, Л.П. Позднякова, В.С. Рыбченко, Д.А. Долгих, П.Г. Свешников, М.П. Кирпичников. Получение и свойства рекомбинантных белков на основе широко нейтрализующего антитела против вируса гриппа типа А // ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 16. БИОЛОГИЯ — 2016. — № 2. — С. 25-31.
2. Аргентова В.В., **Алиев Т.К.**, Зарубаев В.В., Клотченко С.А., Штро А.А., Сергеева М.В., Топорова В.А., Долгих Д.А., Свешников П.Г., Васин А.В., Кирпичников М.П. Противовирусная активность in vitro рекомбинантных антител IgG- и IgA-изотипов к гемагглютиниру вируса гриппа А // Молекулярная биология. — 2017. — Т. 51, № 6. — С. 927–937.
3. Аргентова В.В., **Алиев Т.К.**, Топорова В.А., Рыбченко В.С., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Изучение влияния эукариотических векторов различных конструкций на экспрессию рекомбинантных антител IgA1-изотипа // ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 16. БИОЛОГИЯ — 2017. — № 2. — С. 75–81.
4. **Т.К. Алиев**, И.Г. Дементьева, В.А. Топорова, В.В. Аргентова, Л.П. Позднякова, М.Н. Боков, Д.А. Долгих, П.Г. Свешников, М.П. Кирпичников. Получение и иммунохимические свойства димера иммуноглобулина А, специфичного к гемагглютиниру вируса гриппа А // Доклады Академии наук. — 2018. — Т. 478, № 5. — С. 1-3.
5. **Т.К. Алиев**, И.Г. Дементьева, В.А. Топорова, В.В. Аргентова, Л.П. Позднякова, М.Н. Боков, Ю.А. Вотчицева, Д.А. Долгих, С.Д. Варфоломеев, П.Г. Свешников, М.П. Кирпичников. Получение и исследование свойств рекомбинантного иммуноглобулина А, специфичного к гемагглютиниру вируса гриппа // Acta Naturae. — 2018. — Т. 10, № 2 (37). — С. 33-40.

### Тезисы докладов конференций

1. Argentova V.V., Balabashin D.S., Toporova V.A., **Aliev T.K.**, Panina A.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Novel bi-promoter expression system for the production of recombinant IgG antibody. The 7th PEGS Europe Protein & Antibody Engineering Summit ( 2–6 November 2015 in Lisbon, Portugal.), Lisbon, Epic Sana Hotel, Португалия, 2-6 ноября 2015
2. **T.K. Aliev**, V.V. Argentova, V.A. Toporova, I.G. Demytyeva, L.P. Pozdnyakova, M.N. Bokov, D.A. Dolgikh, P.G. Sveshnikov, M.P. Kirpichnikov. Development and Analysis of Different Recombinant Isoforms of IgA Broadly Specific to Different Subtypes of Influenza A Viruses. V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России. 4-8 октября 2016. Сочи, Россия.
3. V.V. Argentova, **T.K. Aliev**, V.A. Toporova, V.S. Rybchenko, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov. The Expression System for the Production of Recombinant Hemagglutinin-specific Monomers and Dimers of Human Immunoglobulin A in CHO Cells. Trends in Influenza Research 2017. 18-20 Sep 2017, St. Petersburg, Russia
4. **Aliev T.**, Argentova V., Dement'yeva I., Klotchenko S., Sergeeva M., Shtro A., Taraskin A., Toporova V., Pozdnyakova L., Dolgikh D., Sveshnikov P., Vasin A., Kirpichnikov M. Immunochemical and Virus Neutralization Properties of a Recombinant Human Immunoglobulin A Specific to Influenza Virus A Hemagglutinin. Trends in Influenza Research 2017. 18-20 Sep 2017, St. Petersburg, Russia