АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (PhD) по образовательной программе «8D05105-Биотехнология»

Баянды Гүлшат Асхатқызы

на тему: **«Получение и характеристика наноантител против вируса бешенства»**

Общее описание диссертационной работы: Диссертация посвящена разработке новых биологических препаратов против вируса бешенства. В ходе исследования была получена рекомбинантная тримерная форма гликопротеина вируса бешенства на основе домена тримеризации человеческого коллагена типа XVIII, и определены её иммуногенные и защитные свойства. С помощью технологии фагового дисплея были получены наноантитела, специфичные к гликопротеину вируса бешенства, и созданы их различные мультимерные формы.

Актуальность темы исследования. Бешенство — особо опасная вирусная инфекция, поражающая центральную нервную систему. Во всем мире бешенство является эндемичным заболеванием более чем в 150 странах и территориях. Ежегодно это заболевание приводит к экономическим потерям в размере около 8,6 млрд долларов США и уносит жизни более 60 000 человек, 96% случаев смерти приходится на страны Азии и Африки. Опасность бешенства связана с отсутствием в настоящее время эффективных методов его лечения и летальным исходом заболевания.

Бешенство среди людей также представляет значительную угрозу для общественного здравоохранения Республики Казахстан. По данным Министерства здравоохранения Республики Казахстан, в 2025 году в стране было зарегистрировано 3 случая бешенства с летальным исходом, тогда как в 2024 году такие случаи не регистрировались. В связи с укусами, царапинами или ослюнением животными в 2025 году за медицинской помощью обратились 60 153 человека, а в первом квартале 2026 года — 14 134 человека. На территории Казахстана сохраняются природные очаги бешенства и продолжают регистрироваться случаи заболевания среди животных. В связи с этим совершенствование мер профилактики бешенства и разработка эффективных биологических препаратов против данной инфекции остаются актуальной задачей.

Специфическая профилактика бешенства основана на применении вакцин и антирабических иммуноглобулинов. Однако риск развития побочных реакций, зависимость от донорского материала, высокая стоимость и ограниченная доступность препятствуют широкому применению традиционных иммуноглобулинов. В связи с этим Всемирная организация здравоохранения рекомендует разработку альтернативных биологических препаратов для профилактики бешенства.

Наноантитела рассматриваются как перспективные биологические агенты против вирусных инфекций благодаря их высокой специфичности,

стабильности, растворимости и способности хорошо проникать в ткани. Возможность получения наноантител в различных форматах с использованием методов генной инженерии позволяет улучшать их функциональные свойства. В частности, мультимеризация может повышать их авидность и вируснейтрализующую активность. В связи с этим получение высокоспецифичных наноантител против вируса бешенства и исследование их защитной активности являются актуальным научным направлением.

В связи с этим получение новых наноантител, направленных против G-гликопротеина вируса бешенства, а также повышение их специфического связывания и защитной активности является одним из актуальных направлений совершенствования биологических препаратов против инфекционных заболеваний.

Объекты исследования: рекомбинантные белки rRABV-GE и rRABV-G-XVIII, а также рекомбинантные наноантитела, специфичные к гликопротеину вируса бешенства и обладающие вируснейтрализующей активностью.

Предмет исследования: иммуногенные свойства тримерной формы гликопротеина вируса бешенства, а также специфичность, аффинность и вируснейтрализующая активность наноантител.

Цель исследования: конструирование рекомбинантной тримерной формы гликопротеина вируса бешенства (RABV-G) на основе домена тримеризации коллагена XVIII типа человека и оценка её эффективности в условиях *in vitro* и *in vivo*; разработка новых наноантител для эффективной нейтрализации вируса бешенства и оценка их биологической активности.

Задачи исследования:

1. Сконструировать рекомбинантные гены, кодирующие мономерную (rRABV-GE) и тримерную (rRABV-G-XVIII) формы эктодомена гликопротеина вируса бешенства (RABV-G).
2. Осуществить функциональную экспрессию белков rRABV-GE и rRABV-G-XVIII в системе E. coli и выделить рекомбинантные белки в очищенном виде.
3. Оценить иммуногенность и противовирусную защитную активность белков rRABV-GE и rRABV-G-XVIII в условиях *in vitro* и *in vivo.*
4. Сконструировать кДНК-библиотеку наноантител (VHH), специфичных к рекомбинантному белку RABV-G-XVIII, с использованием технологии фагового дисплея и провести селекцию вирус-специфических фаговых клонов.
5. Получить ди- и тримерные наноантитела, специфичные к рекомбинантному белку RABV-G-XVIII.
6. Провести характеристику моно-, ди- и тримерных наноантител и оценить их противовирусную защитную активность в условиях *in vitro* и *in vivo.*

Методы исследования: молекулярно-генетические методы (выделение и клонирование генов, ОТ-ПЦР, ПЦР), биохимические методы (аффинная и гель-фильтрационная хроматография), иммунологические методы (ИФА, вестерн-блоттинг, реакция вирусной нейтрализации), а также методы фагового дисплея (биопэннинг) и гель-электрофорез.

Научная новизна исследования:

- Впервые была создана тримерная рекомбинантная форма гликопротеина вируса бешенства rRABV-G-XVIII на основе домена тримеризации человеческого коллагена типа XVIII, экспрессированного в системе *E. coli* SHuffle и выделенного в высокой степени чистоты.

- Были выявлены высокие иммуногенные и защитные свойства белка rRABV-G-XVIII. При иммунизации в отсутствие адъюванта rRABV-G-XVIII индуцировал вирус-специфический антительный ответ у мышей и обеспечивал полную защиту от летальной дозы вируса бешенства.

- Впервые были выделены специфические наноантитела к вирусу бешенства из кДНК-библиотеки верблюдов-дромадеров, иммунизированных антигеном RABV-G-XVIII, и синтезированы их димерные и тримерные формы. Была проведена сравнительная оценка биологической активности мономерных, димерных и тримерных наноантител, и установлено, что тримерная форма обеспечивает 100% защиту от летальной дозы вируса бешенства *in vivo.*

Практическая значимость исследования. Результаты исследования формируют научно-практическую основу для разработки новых поколений рекомбинантных вакцин против вируса бешенства, терапевтических наноантител и высокочувствительных диагностических тест-систем. Сконструированный рекомбинантный антиген rRABV-G-XVIII рассматривается как перспективный кандидат для создания эффективных субъединичных вакцин против бешенства. Высокая протективная активность тримерных наноантител *in vivo* позволяет рассматривать их в качестве потенциальных агентов для постэкспозиционной профилактики и терапии бешенства.

Теоретическая значимость. Данное исследование вносит вклад в углубленное понимание взаимосвязи между структурной организацией гликопротеина вируса бешенства (RABV-G) и его иммуногенными свойствами. Полученные результаты подтверждают важную роль тримерной конформации антигена в формировании и усилении иммунного ответа, тем самым дополняя теоретические знания в области структурной иммунологии и вирусологии.

Кроме того, сравнительное исследование мономерных, димерных и тримерных форм наноантител, полученных от дромедарных верблюдов, предоставляет новые научные данные о влиянии мультимеризации наноантител на их биологическую активность и позволяет более глубоко понять механизмы вируснейтрализующего действия.

Основные положения, выносимые на защиту диссертации:

1. Конструкция rRABV-G-XVIII, объединённая с доменом тримеризации коллагена XVIII типа человека, впервые была экспрессирована в системе экспрессии *E. coli* SHuffle и выделена в очищенном виде.

2. Показано, что антиген RABV-G-XVIII обладает более высокой иммуногенностью и эффективностью по сравнению с рекомбинантным белком rRABV-GE. Установлено, что RABV-G-XVIII формирует стабильную тримерную структуру, индуцирует выраженный гуморальный иммунный ответ и характеризуется вируснейтрализующей активностью, сопоставимой с эффективностью инактивированной вакцины против бешенства.

3. Введение антигена RABV-G-XVIII без адъюванта индуцирует высокий уровень высокоаффинных вируснейтрализующих антител и обеспечивает полную защиту всех экспериментальных животных от летальной дозы вируса бешенства. Эти данные свидетельствуют о высокой стабильности тримерного белка, экспрессируемого в бактериальной системе, и его потенциале для разработки эффективной и доступной вакцины.

4. Наноантитела против вируса бешенства были получены и охарактеризованы из кДНК-библиотеки дромедарных верблюдов (*Camelus dromedarius*), иммунизированных антигеном RABV-G-XVIII, с использованием технологии фагового дисплея.

5. Для повышения вируснейтрализующей активности наноантител были сконструированы их димерные и тримерные формы, что привело к значительному увеличению их аффинности к вирусу.

6. Проведено сравнительное исследование мономерных, димерных и тримерных наноантител, при этом установлено, что тримерная форма обеспечивает 100% защиту от летальной дозы вируса бешенства *in vivo.* Это подтверждает высокий терапевтический потенциал данных молекул.

Связь с планом основных научных работ. Настоящая диссертационная работа выполнена в рамках грантового проекта Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан на 2022–2024 годы AP14870256 «Разработка новых наноантител, направленных на эффективную нейтрализацию вируса бешенства и их использование в качестве высокоспецифичных и чувствительных реагентов для экспресс-диагностики».

Личный вклад докторанта в подготовку каждой публикации включает обзор научной литературы, планирование и проведение экспериментов, сбор полученных данных, их интерпретацию и статистическую обработку, а также описание результатов с последующим обсуждением.

Апробация научно-исследовательской работы. Материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на следующих научных конференциях:

- Международная научно-практическая конференция «Генетика и физиология: прошлое, настоящее, будущее» (27–30 мая 2025 г., Алматы, Казахстан);
- Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби әлемі» (3–5 апреля 2025 г., Алматы, Казахстан);
- 2-я Международная конференция по биотехнологии и биомедицинским исследованиям (9–10 апреля 2025 г., Манила, Филиппины);
- VII Международная научно-практическая конференция «Перспективы формирования и развития научной школы фармации: преемственность поколений» в рамках A ANaMed Forum – New Generation 2025, посвящённая 80-летию профессора Р. Дилбарханова (4–5 июня 2025 г., Алматы, Казахстан).

Публикации:

1. Баянды Г.А., Ахметсадыков Н.Н., Бисенбаев А.К. Молекулярно-генетическая характеристика вируса бешенства, патогенез и достижения в

диагностике и разработке средств борьбы // Вестник КазНУ, серия биологическая, - 2023. – Том 95, №2. – С.4-20.
https://doi.org/10.26577/eb.2023.v95.i2.01.

2. Smekenov, I.; Bayandy, G.; Alybayev, S.; Baltakhozha, N.; Batanova, Zh.; Akhmetsadykov, N.; Bissenbaev, A. Immunogenicity and Antigenicity of the Recombinant Ectodomain of Rabies Virus Glycoprotein Containing the Human Collagen XVIII Trimerization Domain // Vaccines 2025, 13, 971. https:// doi.org/10.3390/vaccines13090971

3. Bitanova E.Zh., Akhmetsadykov N.N., Abdraimova Zh.A., Batanova Zh.N., Baikara B.T., Bayandy G.A., Krykbayev Y.A.1, Nurmuhambetova A.B., Imanbekova T.A. Methods of anti-rabic immunoglobulin production // Фармация Казахстана, экспериментальная медицина, 2024, 287.
https://doi.org/10.53511/pharmkaz.2024.46.70.034.

4. Баянды Г.А., Балтақожа Н. Б, Сайлауова Г.Н., Нұрпейіс Қ.Б., Смекенов И.Т., Бисенбаев А. К.// Production of the Soluble Form of the Rabies Virus Glycoprotein Ectodomain as a Subunit Vaccine Candidate. Журнал International Journal of Biology and Chemistry.