Әль-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті

ӘӨЖ 601.4:577.21(043) Қолжазба құқығында

БАЯНДЫ ГҮЛШАТ АСХАТҚЫЗЫ

Құтыру вирусына қарсы наноантиденелерді алу және сипаттау

8D05105-Биотехнология

Философия докторы (PhD)
дәрежесін алу үшін дайындалған диссертация

Отандық ғылыми кеңесші:
б.ғ.д., профессор,
ҚР ҰҒА академигі,
Бисенбаев Амангельды Қуанбаевич

Шет елдік ғылыми кеңесші:
PhD, профессор,
Сапарбаев Мурат Калиевич
Париж, Франция

Қазақстан Республикасы
Алматы, 2026

МАЗМҰНЫ

АНЫҚТАМАЛАР..... 5
БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР..... 6
КІРІСПЕ..... 8
1 ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ..... 13
1.1 Құтыру вирусының молекулалық-генетикалық сипаттамасы..... 13
1.1.1 Вирустың таксономиясы мен сипаттамасы…… 13
1.1.2 Құтыру вирусының геномы: құрылымы мен ерекшеліктері…… 14
1.1.3 Вирустың құрылымдық ақуыздары..... 15
1.2 Құтыру вируының патогенезі…… 17
1.3 Құтырудың таралуының Қазақстандағы және әлемдегі қазіргі заманғы ерекшеліктері……. 21
1.4 Антирабиялық емдік препараттар: жетістіктері мен болашағы……. 24
1.4.1 Құтыруға қарсы вакциналар……... 24
1.4.2 Құтыруға қарсы антирабиялық иммуноглобулиндер……... 28
1.5 Наноантиденелердің құрылымы және ерекшеліктері……. 30
1.6 Коллагеннің тримеризациялық құрылымдары мен олардың наноантиденелердің биологиялық тиімділігіне әсері…… 34
1.6.1 Коллаген домені және оның тримеризациядағы рөлі……..... 34
1.6.2 Адамның XVIII типті коллагенінің қасиеттері..... 35
1.6.3 Наноантиденелердің тиімділігін арттырудағы тримерлік форматтардың маңыздылығы..... 36
2 ЗЕРТТЕУ ОБЪЕКТІЛЕРІ МЕН ӘДІСТЕРІ..... 38
2.1 Материалдар мен құралдар..... 38
2.1.1 Вакцина..... 38
2.1.2 Құтыру вирусы..... 38
2.1.3 Этикалық мәлімдеме..... 38
2.1.4 Жасуша линиялары..... 38
2.2 Зерттеу әдістері..... 39
2.2.1 RABV-G плазмидасын конструкциялау..... 39
2.2.2 Плазмидаларды бөлу..... 40
2.2.3 Полимеразды тізбекті реакция..... 40
2.2.4 аРНҚ бөліп алу..... 41
2.2.5 Кері транскрипция реакциясы..... 42
2.2.6 ДНК молекуласының рестрикциясы мен элюциясы..... 42
2.2.7 ДНҚ фрагменті мен векторды лигирлеу..... 42
2.2.8 *Escherichia coli* компетентті клеткаларын дайындау..... 43
2.2.9 *Escherichia coli* бактерияларының трансформациясы..... 43
2.2.10 *Escherichia coli* бактериалды клеткаларындағы белок экспрессиясы..... 44
2.2.11 Ақуыздарды бөліп алу және металл-аффинді хроматографиялық әдіспен тазалау..... 44
2.2.11.1 Ақуыздардың еритін фракциялары..... 44
2.2.11.2 Ақуыздардың ерімейтін фракциялары..... 45

2.2.12 ПААГ электрофорез..... 46
2.2.13 Вестерн блоттинг..... 46
2.2.14 Гель-фильтрация..... 47
2.2.15 Поликлональды антиденелерді дайындау..... 47
2.2.16 ИФТ әдісімен антисарысулардың титрін анықтау..... 47
2.2.17 Антисарысулардың нейтрализация реакциясы әдісі..... 48
2.2.18 Дромедарлардың иммунизациясы..... 48
2.2.19 Түйелердің шеткі қанынан лимфоциттерді бөліп алу..... 49
2.2.20 VHH-тің (наноантидененің) өз кітапханасын жасау 49
2.2.21 RABV-G ақуызына спецификалық оң клондарды бөліп алу (биопэннинг)..... 50
2.2.22 ИФТ әдісі арқылы спецификалық VHH клондарына скрининг жасау……. 50
2.2.23 ПТР өнімдерін секвенирлеу..... 51
2.2.24 Құтыру вирусына қарсы наноантиденелердің бейтараптандыру әсерін тышқандарда талдау..... 51
2.2.25 Статистикалық анализ..... 52
3 НӘТИЖЕЛЕР МЕН ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ..... 53
3.1 Құтыру вирусының G-ақуызының рекомбинантты дұрыс конформацияланаған түріндегі экспрессиясы және экспрессия өнімі антигенділігінің бағалануы..... 53
3.1.1 rRABV-GE және rRABV-G-XVIII гендерінің экспрессиясына арналған рекомбинантты ДНҚ-конструкциясын алу..... 53
3.1.2 rRABV-GE және rRABV-G рекомбинантты ақуыздарын *E. coli* SHuffle экспрессиялық штамында экспрессиялау……. 56
3.1.3 rRABV-GE және rRABV-G экспрессиялық ақуыздарының иммуногенділігін салыстырмалы талдау..... 59
3.2 RABV-G-XVIII-ге спецификалық наноантиденелердің кДНҚ-VHH кітапханасын фагтық дисплей әдісімен құрастыру және селекциясы..... 65
3.2.1 Иммундық наноантидене кітапханасын құрастыру..... 65
3.2.2 RABV-G-XVIII-ге спецификалық наноантиденелердің экспрессиясы мен тазартылуы …… 72
3.3 RABV-ке спецификалық би- және үшвалентті наноантиденелерді алу 76
3.3.1 Дивалентті және тривалентті наноантиденелерді кодтайтын гендердің экспрессиясы үшін рекомбинантты ДНҚ құрылымын жасау..... 76
3.3.2 Димерлі және тримерлі формадағы рекомбинантты наноантиденелердің *E. coli* SHuffle экспрессиялық штамында экспрессиялануы..... 80
3.4 RABV-ке спецификалық моно-, би- және тривалентті наноденелердің сипаттамасы және олардың RABV-ті бейтараптандыру тиімділігін зерттеу..... 82

3.4.1 Наноантиденелердің титрін ИФТ әдісімен анықтау..... 82
3.4.2 Ақ тышқандарда *in vivo* жағдайында наноантиденелердің бейтараптандыру қабілетін анықтау..... 84
ҚОРЫТЫНДЫ..... 86
ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ..... 88

АНЫҚТАМАЛАР

Осы диссертациялық жұмыста сәйкес анықтамалармен төмендегі терминдер қолданылды:

Авидтілік - антидененің антигенмен бірнеше байланысу нүктелері арқылы жалпы байланысу беріктігі.

Антигендер - адам және жануарлар организміне түскен кезде иммундық реакция шақыратын табиғаты жағынан бөгде заттар.

Антиденелер - иммундық жүйе зиянды заттарды анықтаған кезде шығаратын ақуыздар.

Белок экспрессиясы - гендегі ақпарат негізінде жасушада белгілі бір ақуыздың синтезделу үдерісі.

Биопаннинг - нысана-антигенмен арнайы байланысатын фагтарды іріктеу үдерісі.

Вектор - бөгде генетикалық материалды жасушаға енгізуге және көбейтуге арналған ДНҚ молекуласы.

Вируленттілік - микроорганизмнің ауру туғызу қабілетінің дәрежесі.

Ген - белгілі бір ақуыз немесе РНҚ синтезін анықтайтын ДНҚ бөлігі.

Иммундау - организмде белгілі бір инфекцияға қарсы арнайы иммундық жауап қалыптастыру үдерісі.

Иммуногенділік - антигеннің организмде иммундық жауап туғызу қабілеті.

Наноантиделер - түйетұқымдастардың ауыр тізбекті антиденелерінен алынатын антигенмен спецификалық байланысатын шағын вариабельді домендер (VHH).

Таксономия - организмдерді ортақ белгілері мен туыстық байланыстарына қарай жіктеу жүйесі.

Трансформация - рекомбинантты плазмидалық ДНҚ-ны бактериялық жасушаға енгізу үдерісі.

Штамм - бір түрге жататын микроорганизмнің белгілі бір қасиеттерімен ерекшеленетін генетикалық нұсқасы.

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР

CDR – комплементарлықты анықтайтын аймақ

CVS-11 – құтыру вирусының стандартты зертханалық штаммы

CVS-27 – құтыру вирусының стандартты зертханалық штаммы

ERIG – жылқы текті антирабиялық иммуноглобулин

HcAb – ауыр тізбекті антиденелер

HDCV – құтыруға қарсы адамның диплоидты жасушалық вакцинасы

HRIG – адам текті антирабиялық иммуноглобулин

MAbs – моноклоналды антиденелер

nAChR – никотиндік ацетилхолиндік рецептор

Pfu – бляшка түзуші бірлік

RABV – құтыру вирусы

RABV-G – құтыру вирусының G белогы

RIG – құтыруға қарсы иммуноглобулин

SDS – натрий додецилсульфаты

VHH – ауыр тізбекті антидененің вариабельді домені

ДТТ – Дитиотреитол

ИПТГ – изопропил-бета-d-тиогалактопиранозид

ИФТ – иммуноферментті талдау

кДНҚ – комплементарлы ДНҚ

КОЕ – колония түзуші бірлік

ПААГ – полиакриламидті гель

ПТР – Полимеразды тізбекті реакция

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭП – постэкспозициялық профилактика

РНҚ – рибонуклеин қышқылы

РНП – рибонуклеопротеин

ЦПӘ – цитопатикалық әсер

ЭДТА – этилендиаминтетрасірке қышқылы

ICTV – Вирустар таксономиясы жөніндегі халықаралық комитет

КІРІСПЕ

Жұмыстың жалпы сипаттамасы: Диссертациялық жұмыс құтыру вирусына қарсы жаңа биологиялық препараттарды әзірлеуге бағытталған. Зерттеу барысында адамның XVIII типті коллагенінің тримеризация домені негізінде құтыру вирусының гликопротеинінің рекомбинантты тримерлік формасы құрастырылып, оның иммуногенділік және қорғаныс қасиеттері анықталды. Фаг-дисплей технологиясының көмегімен құтыру вирусының гликопротеиніне спецификалық наноантиденелер алынып, олардың димерлі және тримерлі формалары конструкцияланды.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі: Құтыру – орталық жүйке жүйесін зақымдайтын аса қауіпті вирустық инфекция. Дүниежүзі бойынша құтыру 150-ден астам елдер мен аумақтарда эндемиялық ауру болып саналады. Бұл ауру жыл сайын шамамен 8,6 млрд АҚШ доллары көлемінде экономикалық шығынға әкеліп, 60 000-нан астам адамның өмірін қияды (оның 96%-ы Азия мен Африка елдеріне тиесілі) [1]. Құтырудың қауіптілігі - қазіргі уақытқа дейін оны тиімді емдеу әдісінің болмауымен және аурудың өліммен аяқталуымен байланысты.

Адамдар арасындағы құтыру Қазақстан Республикасының қоғамдық денсаулық сақтау саласына да едәуір қауіп тудырады. Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігінің мәліметі бойынша, 2025 жылы елімізде өліммен аяқталған құтырудың 3 жағдайы тіркелген, ал 2024 жылы мұндай жағдайлар анықталмаған. Жануарлардың тістеуі, тырнауы немесе сілекейінің жұғуына байланысты 2025 жылы 60 153 адам, ал 2026 жылдың бірінші тоқсанында 14 134 адам медициналық көмекке жүгінген [2]. Қазақстан аумағында құтырудың табиғи ошақтары сақталған және жануарлар арасында ауру жағдайлары тіркеліп отырады [3]. Осыған байланысты құтырудың алдын алу шараларын жетілдіру және инфекцияға қарсы тиімді биологиялық препараттарды әзірлеу өзекті мәселе болып қала береді.

Құтырумен күресудің басты тәсілі вакциналар мен антирабиялық иммуноглобулиндерді (RIG) қолдануға негізделген спецификалық профилактика болып табылады [4]. RIG құтыруға қарсы вакцинамен иммундаудан өткен жылқылардың (ERIG) немесе адамдардың (HRIG) сарысуынан алынады. ERIG иммуноглобулиндерін қолдану кезінде жанама әсерлердің даму қаупі жоғары болғандықтан, олар көбінесе пепсинмен өңделген Fab-фрагменттері түрінде пайдаланылады. HRIG иммуноглобулиндерін өндіру үшін көп мөлшерде иммунды донорлар қажет, сондай-ақ донорлардан инфекциялық агенттердің берілу қаупі сақталады [5]. Әлемдік деңгейде иммуноглобулин негізіндегі препараттардың тапшылығы мен олардың құнының жоғары болуы бұл өнімдердің қолжетімділігін төмендетеді. Сондықтан Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымы (ДДҰ) балама биологиялық препараттарды әзірлеуді ұсынады.

Қазіргі уақытта наноантиденелер ауыр вирустық инфекцияларды емдеуде перспективалы терапиялық агенттер ретінде қарастырылуда. Наноантиденелер Camelidae тұқымдасына жататын жануарларда табиғи түрде кездесетін, тек ауыр

тізбектерден тұратын антиденелердің антигенмен байланысатын вариабельді домені болып табылады. Олардың молекулалық массасы шамамен 15 кДа құрайды [6]. Наноантиденелер дәстүрлі антиденелермен салыстырғанда бірнеше маңызды артықшылықтарға ие. Оларды гендік инженерия әдістері арқылы бактериялық экспрессиялық жүйелерде көп мөлшерде өндіруге болады. Сонымен қатар наноантиденелер жоғары ерігіштігімен, температура мен pH-тың өзгерістеріне тұрақтылығымен және *in vivo* жағдайында тіндерге жақсы ену қабілетімен сипатталады [7]. Бұл қасиеттер наноантиденелерді әртүрлі ауруларды, соның ішінде құтыруды диагностикалау мен емдеуде тиімді биологиялық құрал ретінде пайдалануға мүмкіндік береді.

Гендік инженерия әдістері арқылы наноантиденелерді мультимерлік форматтарға (димер, тример) біріктіру авидтілікті арттырып, вирусты бейтараптандыру қабілетін күшейтеді. Тримерленген наноантиденелер антигеннің табиғи тримерлі құрылымын тиімді тану арқылы вирусқа қарсы әсерін айтарлықтай жоғарылататыны дәлелденуде [8]. Құтыру вирусына қарсы жоғары спецификалы наноантиденелерді алу және олардың *in vivo* қорғаныс қабілетін дәлелдеу бағытындағы зерттеулер әлі де жеткіліксіз.

Сондықтан құтыру вирусының G гликопротеиніне бағытталған жаңа наноантиденелерді алу және олардың спецификалық байланысуы мен қорғаныс белсенділігін арттыру инфекциялық ауруларға қарсы биопрепараттарды жетілдірудегі өзекті бағыттардың бірі болып табылады.

Зерттеу мақсаты: адам XVIII коллагенінің тримеризация домені негізінде құтыру гликопротеинінің (RABV-G) рекомбинантты тримерлік формасын құрастыру және оның тиімділігін *in vitro* және *in vivo* жағдайларында бағалау. Құтыру вирусын тиімді бейтараптандыруға арналған жаңа наноантиденелерді әзірлеу және олардың биологиялық белсенділігін бағалау.

Зерттеудің міндеттері:

1. RABV-G эктодоменінің мономерлі (rRABV-GE) және тримерлі (rRABV-G-XVIII) формаларын кодтайтын рекомбинантты гендерді құрастыру.
2. *E.coli* жүйесінде rRABV-GE және rRABV-G-XVIII ақуыздарының функционалды экспрессиясын жүзеге асыру және рекомбинантты белоктарды таза күйінде бөліп алу.
3. rRABV-GE және rRABV-G-XVIII ақуыздарының иммуногенділігі мен вирусқа қарсы қорғаныс белсенділігін *in vitro* және *in vivo* жағдайларында бағалау.
4. RABV-G-XVIII рекомбинантты ақуызына спецификалық наноантиденелердің (VHH) кДНҚ кітапханасын фаг-дисплей әдісі негізінде құрастыру және вирусқа спецификалық фаг клондарын селекциялау.
5. RABV-G-XVIII рекомбинантты ақуызына спецификалық ди- және тримерлік наноденелерді алу.
6. Моно-, ди- және тримерлік наноантиденелердің сипаттамасы және олардың вирусқа қарсы қорғаныс белсенділігін *in vitro* және *in vivo* жағдайларда бағалау.

Зерттеу обьектісі: rRABV-GE және rRABV-G-XVIII рекомбинантты ақуыздары және құтыру вирусының гликопротеиніне қарсы бағытталған рекомбинантты наноантиденелер.

Зерттеу әдістері: гендерді бөліп алу және клондау, кері транскрипция (ОТ), полимеразды тізбекті реакция (ПТР), иммунды-ферменттік талдау (ИФА), рестрикциялық талдау, гель-электрофорез, аффинді және гель-фильтрациялы хроматография, антиденелерді алу және тазарту, Вестерн-блоттинг, биопэннинг, вирусты нейтрализациялау реакциясы.

Зерттеу жұмысының ғылыми жаңалығы:

- Алғаш рет адамның XVIII типті коллагенінің тримерлену домені негізінде құтыру вирусы гликопротеинінің тримерлі рекомбинантты формасы rRABV-G-XVIII құрастырылып, *E. coli* SHuffle жүйесінде экспрессияланды және жоғары тазалықта бөлініп алынды.

- rRABV-G-XVIII ақуызының жоғары иммуногендік және қорғаныш қасиеттері анықталды. Адъювантсыз жағдайда иммундау кезінде rRABV-G-XVIII тышқандарда вирусқа спецификалық антиденелік жауап қалыптастырып, құтыру вирусының өлімге әкелетін дозасына қарсы толық қорғаныш қамтамасыз етті.

- Алғаш рет RABV-G-XVIII антигенімен иммундалған дромедар түйелерінің кДНҚ кітапханасынан құтыру вирусына спецификалық наноантиденелер алынып, олардың димерлі және тримерлі формалары құрастырылды. Мономерлі, димерлі және тримерлі наноантиденелердің биологиялық белсенділігі салыстырылып, тримерлі форманың *in vivo* жағдайда құтыру вирусының өлімге әкелетін дозасына қарсы 100% қорғаныш қамтамасыз ететіні анықталды.

Зерттеудің теориялық және практикалық құндылығы. Зерттеу жұмысы құтыру вирусының гликопротеинінің (RABV-G) құрылымдық ұйымдасуы мен оның иммуногендік қасиеттері арасындағы өзара байланысты терең түсінуге үлес қосады. Алынған нәтижелер антигеннің тримерлік конформациясының иммундық жауапты күшейтудегі маңызды рөлін дәлелдейді және құрылымдық иммунология саласындағы теориялық тұжырымдамаларды толықтырады.

Дромедар түйелерінен алынған наноантиденелердің мономерлі, димерлі және тримерлі формаларын салыстыру олардың антигенмен байланысу және вирусқа қарсы белсенділігін бағалауға мүмкіндік берді. Зерттеу нәтижелері құтыру вирусына қарсы жаңа буынды рекомбинантты вакциналарды, терапиялық наноантиденелер мен жоғары сезімтал диагностикалық тест-жүйелерді әзірлеу үшін практикалық негіз болып табылады.

Қорғауға ұсынылатын негізгі тұжырымдар:1. Адам коллагенінің XVIII тримерлеу доменімен біріктірілген rRABV-G-XVIII рекомбинантты ақуызы алғаш рет *E. coli* SHuffle экспрессиялық жүйесінде экспрессияланып, таза күйде бөлініп алынды.

2. RABV-G-XVIII антиген ретінде иммуногенділігі мен тиімділігі тұрғысынан rRABV-GE рекомбинантты ақуызынан жоғары екені дәлелденді.

RABV-G-XVIII тұрақты тримерлі форма түзіп, жоғары деңгейде гуморальды иммундық жауап қалыптастырды.

3. Адъювантсыз жағдайда RABV-G-XVIII антигенін енгізу вирусты бейтараптандыратын жоғары аффинді антиденелерді тудырды және барлық тышқандарды құтыру вирусының өлімге әкелетін дозасынан толық қорғады.

4. Құтыру вирусына қарсы наноантиденелер фаг дисплей әдісін пайдаланып RABV-G-XVIII антигенімен иммунизацияланған дромедар түйелердің кДНҚ кітапханасынан бөлініп алынды және сипатталды.

5. Наноантиденелердің вирусты бейтараптандыратын әсерін күшейту үшін наноантиденелердің димерлі және тримерлі формалары жасалды, бұл олардың rRABV-G қатысты аффинділігін арттырды.

6. Алынған мономерлі, димерлі және тримерлі наноантиденелер алғаш рет салыстырмалы түрде зерттеліп, тримерлі форманың *in vivo* жағдайында құтыру вирусының өлімге әкелетін дозасынан 100% қорғанысты қамтамасыз ететіні дәлелденді. Бұл олардың терапиялық мақсатта қолданылу потенциалының жоғары деңгейде екенін көрсетеді.

Зерттеу тақырыбының негізгі ғылыми зерттеу жұмыстарының жоспарымен байланысы: Диссертациялық жұмыс Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігі Ғылым комитетінің 2022–2024 жылдарға арналған гранттық қаржыландыру бағдарламасы аясында жүзеге асырылған AP14870256 «Құтыру вирусын тиімді бейтараптандыруға және оны жедел анықтауға арналған жоғары спецификалық әрі сезімтал реагент ретінде қолдануға бағытталған жаңа наноантиденелерді әзірлеу» жобасы шеңберінде орындалды.

Жұмыстың сыннан өтуі: Диссертациялық жұмыстың материалдары келесі ғылыми конференцияларда баяндалып, талқыланды:

- Халықаралық «Генетика және физиология: өткені, бүгіні, болашағы» атты ғылыми-практикалық конференциясы (27-30 мамыр, Алматы 2025);

- студенттер мен жас ғалымдардың «Фараби әлемі» атты халықаралық ғылыми конференциясы (3–5 сәуір, Алматы, 2025);

-Биотехнология және биомедициналық зерттеулер бойынша 2-ші халықаралық конференциясы (9-10 сәуір, Манила, Филиппины, 2025);

- «Профессор Р. Ділбархановтың 80 жылдығына арналған Med Forum – New Generation 2025 шеңберіндегі «Фармацияның ғылыми мектебін қалыптастыру және дамыту перспективалары: ұрпақтар сабақтастығы» VII Халықаралық ғылыми-практикалық конференциясы (4-5 маусым, Алматы, 2025).

Жарияланымдар:

1. Баянды Г.А., Ахметсадыков Н.Н., Бисенбаев А.К. Молекулярно-генетическая характеристика вируса бешенства, патогенез и достиже**н**ия 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, Z.; 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. Bayandy G.A., Baltakhozha N.B., Sailauova G.N., Nurpeis K.B., Smekenov I.T., Bissenbaev A.K. // Production of the Soluble Form of the Rabies Virus Glycoprotein Ectodomain as a Subunit Vaccine Candidate. Журнал International Journal of Biology and Chemistry 2025, 18, №2, 4-14 Б. https://doi.org/10.26577/IJBCh20251821

5. Зерттеу нәтижелері бойынша «Вакциналарда немесе антигендік композицияларда қолдану үшін құтыру вирусының рекомбинантты G-ақуызын алу тәсілі» өнертабысына Қазақстан Республикасының патенттік өтінімі берілген (№2025/1166.1, 26.11.2025 ж.). Қазіргі уақытта сараптама сатысында.

Диссертацияның құрылымы: Диссертация 98 бетте ұсынылған және анықтамадардан, белгілеулер мен қысқартулардан, кіріспеден, әдебиеттерге шолудан, материалдар мен әдістерден, нәтижелер мен талқылаудан, қорытындыдан, 141 пайдаланылған әдебиеттер тізімінен, 8 кестеден және 28 суреттен тұрады.

1 ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ

1.1 Құтыру вирусының молекулалық-генетикалық сипаттамасы

1.1.1 Вирустың таксономиясы мен сипаттамасы

Құтыру - дүние жүзіндегі әртүрлі жануарлардың арасында кең таралған, клиникалық белгілер пайда болғаннан кейін жүз пайыз өлімге алып келетін ең қауіпті вирустық инфекциялардың бірі. Оның қоздырғышы-*Rhabdoviridae* тұқымдасына жататын *Lyssavirus* туысының вирустары болып табылады және ол барлық сүтқоректілерге, соның ішінде адамдарға да әсер етуі мүмкін [9] Вирус жұқтырған жануарлардың сілекейімен байланысқан жағдайда таралады. Клиникалық белгілер байқалғаннан кейін өлім деңгейі іс жүзінде 100%-ды құрайды.

Лиссавирустардың генетикалық айырмашылықтарына негізделген жіктеу жүйесіне сәйкес, құтыру вирусы жеті негізгі генотипке бөлінген. Олардың құрамына классикалық құтыру вирусы (RABV), Лагос жарқанаттарының вирусы, Мокола вирусы, Дювенхаге вирусы, 1 және 2 типті еуропалық жарқанат лиссавирустары, сондай-ақ австралиялық жарқанат лиссавирусы кіреді [10]. Кейінгі зерттеулер нәтижесінде Еуразия аумағындағы жарқанаттардан лиссавирустардың қосымша төрт генотипі анықталды. Олар аравандық, худжандық, иркуттық және батыс-кавказдық лиссавирустар ретінде сипатталған [11]. Адамдар мен жануарлар арасында тіркелетін құтыру жағдайларының басым бөлігі 1-генотипке жататын классикалық құтыру вирусымен байланысты (1-кесте).

1-кесте – Құтыру вирусының штаммдарының сипаттамасы [12]

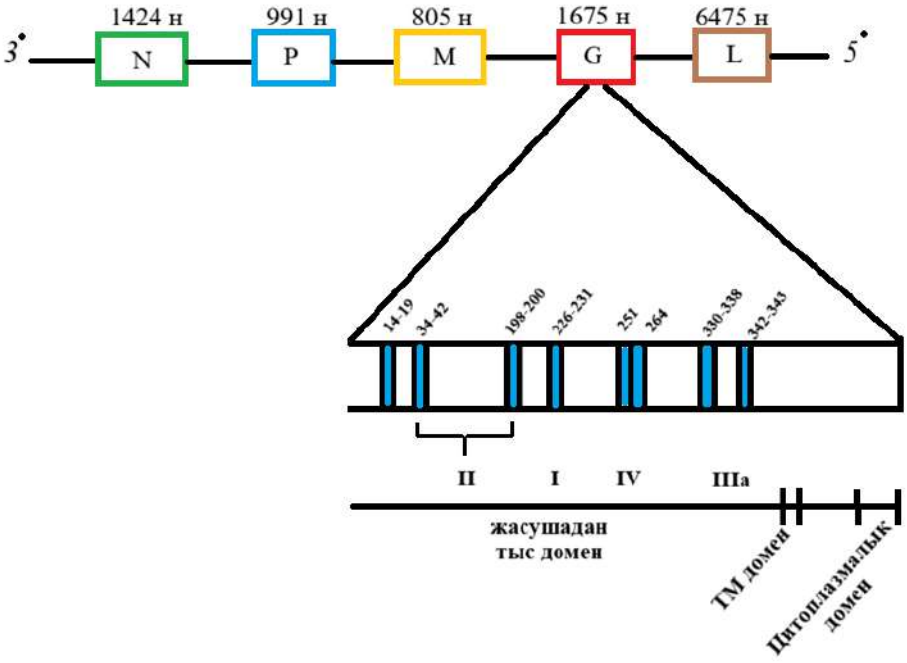
Вирустың типі	Сипаттамасы
Көшелік құтыру вирусы	Табиғи инфекцияланған жануарлардан алынған вирус изоляттары
Аттенуацияланған құтыру вирусы	Патогенділігі әлсіреген вирус штаммы
Патогенді құтыру вирусы	Перифериялық инокуляциядан кейін құтыруды тудыратын штамм
Фиксирленген құтыру вирусы	Пассаждау арқылы қасиеттері тұрақтанған вирус штаммы
Нейротропты құтыру вирусы	Нейрондық жасушаларға жоғары тропизм көрсететін штамм
Нейротропты емес құтыру вирусы	Нейрондарды зақымдау қабілеті төмен штамм

Филогенетикалық талдаулар құтыру вирусының эволюциялық қалыптасуы шамамен 70 миллион жыл бұрын басталғанын көрсетеді [13]. *Rhabdoviridae* тұқымдасына жататын вирустардың эволюциясы олардың әртүрлі иелерге бейімделуімен байланыстырылады. Бұл үдеріс барысында вирустардың өсімдік патогендерінен омыртқасыздармен, кейіннен омыртқалы жануарлармен байланысатын түрлерге дейін дамығаны туралы болжамдар бар. Жануарлар

әлеміндегі омыртқалылардың ішінде құтыру вирусына сезімтал емес немесе табиғи жағдайда сирек сезімтал болатын топтарға құстар, бауырымен жорғалаушылар, балықтар және қосмекенділер жатады [14].

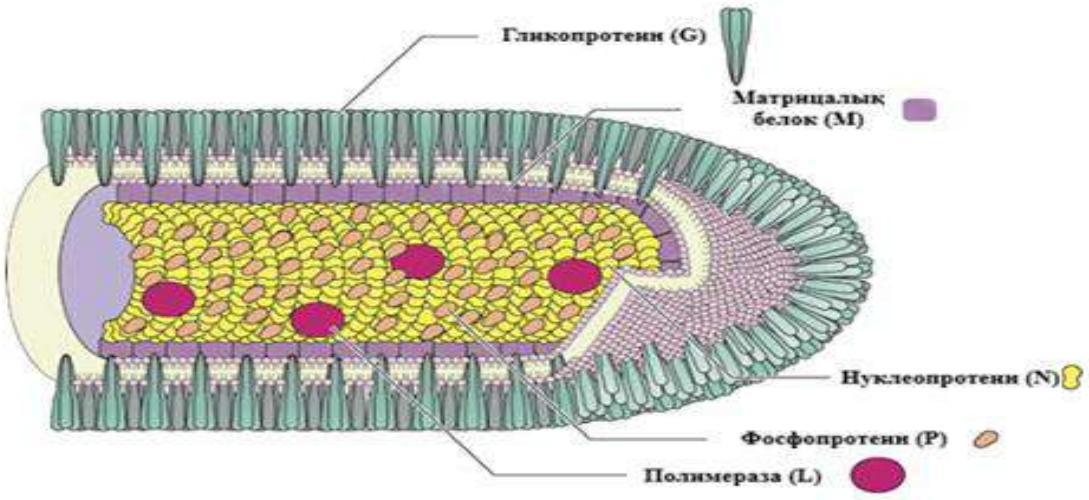
1.1.2 Құтыру вирусының геномы: құрылымы мен ерекшеліктері

Құтыру вирусының вириондары морфологиялық тұрғыдан оқ тәрізді пішінге ие. Олардың ұзындығы 100–430 нм, ал диаметрі шамамен 75 нм болады (2-сурет). Вирустық бөлшектің бір ұшы конус тәрізді, ал қарама-қарсы бөлігі жалпақ болып келеді. Вирионның сыртқы қабатын екі қабатты липидті мембрана құрайды, оның бетінде ұзындығы шамамен 10 нм болатын тікенек тәрізді өсінділер орналасқан [15]. Құтыру вирусы (RABV) нейротропты вирустардың өкілі болып табылады. Оның геномы шамамен 12 мың нуклеотидтен тұратын теріс мағыналы біртізбекті РНҚ молекуласынан құралған. Вирустық геном құрамында бес негізгі құрылымдық белокты кодтайтын гендер орналасқан: нуклеопротеин (N), фосфопротеин (P), матрицалық ақуыз (M), гликопротеин (G) және РНҚ-тәуелді РНҚ-полимераза (L) [16]. Аталған ақуыздарды кодтайтын гендер геном бойында 3′-N-P-M-G-L-5′ бағытында ретімен орналасады (1-сурет).



1-сурет - Құтыру вирусының гендерінің орналасу реті [17,18]

Лиссавирустардың әртүрлі түрлері мен штаммдарында N, M және L белоктарының құрылымы мен ұзындығы ұқсас болып келеді. P белогы мен G гликопротеинінің цитоплазмалық доменінің ұзындығы әртүрлі [17]. Гендер транскрипцияланбайтын генаралық аймақтармен бөлінген. Барлық теріс тізбекті РНҚ вирустары сияқты, РНҚ геномы нуклеопротеинге тығыз оралған (2-сурет). Рибонуклеопротеин (РНП) деп аталатын инкапсулденген РНҚ ғана транскрипция мен репликацияның функционалды үлгісі болып табылады.



2-сурет - Құтыру вирусының вирионы [18]

Басқа РНҚ вирустары сияқты, құтыру вирусының геномы да жоғары мутациялық өзгергіштікпен сипатталады. Бұл вирустың РНҚ-тәуелді РНҚ-полимеразасында репликация кезінде пайда болатын қателерді түзететін 3'→5' экзонуклеазалық белсенділіктің болмауына байланысты. Соның нәтижесінде геном көшірілген кезде нуклеотидтік алмастырулар жиі пайда болып, бір штаммның өзінде генетикалық әртүрлілік қалыптасады. Сондықтан бір организмнен немесе бір вакциналық штаммнан бөлініп алынған вирустардың нуклеотидтік тізбектерінде де аздаған айырмашылықтар анықталуы мүмкін.

1.1.3 Вирустың құрылымдық ақуыздары

L ақуызы вирустың репликациясы мен транскрипциясына қатысатын көпфункционалды ферменттік ақуыз болып табылады. L ақуызы P ақуызымен бірге РНҚ-тәуелді РНҚ-полимераза кешенін түзеді және RABV репликациясы мен транскрипциясына қатысады. N және P ақуыздарымен өзара әрекеттесу арқылы ол вирустық RNP кешенінің құрамына кіреді [19]. L және P ақуыздары жеңіл динеин тізбегімен (DLC1) байланысып, жасушалық микротүтікшелер жүйесіне әсер етеді. Бұл өзара әрекеттесу цитоскелеттің қайта құрылуына және вирустық компоненттердің жасуша ішінде тасымалдануына қатысады, нәтижесінде вирустың бастапқы транскрипция үдерісі тиімді жүреді [20].

P ақуызы бірнеше қызмет атқаратын вирустық ақуыздардың қатарына жатады. Оның құрамына ұзын ретсіз N-терминалды домен (1–90 аминқышқылы), орталық димеризация домені (91–133 аминқышқылы), ретсіз линкер аймағы (134–185 аминқышқылы) және C-терминалды домен кіреді. Осы домендік құрылым P ақуызының вирустық және жасушалық ақуыздарымен өзара әрекеттесуіне мүмкіндік береді. P ақуызының 1–60 аминқышқылдық қалдықтары N ақуызымен байланысып, оның жасуша иесінің РНҚ-сымен спецификалық емес әрекеттесуіне жол бермейді. Ал 11–50 аминқышқылдары L ақуызының белсенділігін қамтамасыз етеді [16]. RABV геномының транскрипциясы мен репликациясы P ақуызының C-терминалды доменінің

N/РНҚ кешенімен байланысуына тәуелді. Сонымен қатар, P ақуызы РНҚ-тәуелді РНҚ-полимеразаның (RdRp) кофакторы ретінде вирустық РНҚ синтезінің жүруіне қатысады.

M ақуызы RABV вириондарының жиналуы, морфогенезі және бүршіктену үдерістерінде маңызды қызмет атқарады, сондықтан ол вирустың патогендік қасиеттерін анықтайтын факторлардың бірі ретінде қарастырылады [21]. M ақуызының 95-позициясындағы аминқышқылдық қалдық RABV-ның цитопатиялық әсерімен байланысты және жасуша мембранасының бұзылуына қатысатыны көрсетілген [19,21,22]. Сонымен қатар, M ақуызы RNP кешенімен және G гликопротеинімен өзара әрекеттесіп, нуклеокапсидтің жасуша мембранасымен байланысуына және G гликопротеині болмаған жағдайда да вирустық бөлшектердің бүршіктену үдерісіне қатысады.

N ақуызы 450 аминқышқылдық қалдығынан тұратын және вирустық РНҚ-мен байланысатын құрылымдық ақуыз болып табылады. Әрбір N ақуызының мономері шамамен 9 рибонуклеотидпен байланысып, вирустық геномның қапталуын қамтамасыз етеді. N ақуызының C-терминалды бөлігінде ішкі реттелмеген аймақтар (IDPR) орналасқан. Бұл аймақтар ақуыз құрылымының шамамен 31%-ын құрайды. Инфекция барысында ең белсенді экспрессияланатын ақуыз болып табылатын N белогы [23] вирустық геномдық РНҚ-ны инкапсуляциялап, оны нуклеазалардан қорғайды және репликация кезінде P белогымен кешен түзеді. Құтыру вирусының P ақуызы N белогының РНҚ-сыз N-соңымен [24] байланысады, ал P ақуызының N-соңы оның РНҚ-мен байланысқан N-белогымен әрекеттесуіне жауап береді.

Құтыру вирусының G ақуызы (RABV-G) вирус қабығының негізгі құрылымдық белогы болып есептеледі. Ол вирустың жалпы ақуыздық құрамының 40%-дан астам үлесін алады. RABV-G -505 аминқышқылдық қалдығынан тұратын I типті трансмембраналық гликопротеин. Оның құрамында вирустың штаммына байланысты екіден төртке дейін потенциалды N-гликозилдену орны болады және олардың тек біреуі немесе екеуі ғана гликозилденеді [25].

Құтыру вирусының G гликопротеині үш негізгі құрылымдық бөліктен тұрады: жасушадан тыс, трансмембраналық және цитоплазмалық домендер [26]. Жасушадан тыс бөлігі үш бірдей суббірліктен құралған гомотример түзеді, әр мономердің құрамында 439 аминқышқылының қалдығы болады. Трансмембраналық домен N-ұшынан есептегенде 460–480 аминқышқылдары аралығын қамтып, шамамен 20 аминқышқылдық қалдықтан тұрады. Ал 44 аминқышқылынан құралған цитоплазмалық домен мембрананың цитоплазмалық бетінде орналасады және вирионның түзілуінің соңғы кезеңінде M ақуызымен өзара әрекеттеседі [27]. Жасушадан тыс домен вирустың сыртқы бетінде орналасып, қабылдаушы жасушаның рецепторларымен тікелей байланысатын жалғыз құрылымдық белок болып саналады. Осыған байланысты ол вирустың жасушаға ену үдерісінде шешуші рөл атқарады және бейтараптандырушы антиденелердің негізгі нысанасы болып табылады [28]. G гликопротеинінің негізгі биологиялық қызметі – никотиндік ацетилхолиндік рецепторлар

(nAChRs), нейрондық жасуша адгезиясының молекуласы, төмен аффинді нейротрофиндік рецепторлар p75, сондай-ақ, p75lyNTR-рецепторы ретінде белгілі RABV рецепторларымен әрекеттесу арқылы жасушаға ену [29].

Құтыру вирусының G гликопротеинінің антигендік құрылымын алғаш рет Lafon және әріптестері зерттеген [30]. Авторлар антигендік учаскелерді анықтау мақсатында тышқан моноклоналды антиденелерін және осы антиденелердің әсеріне төзімді вирус нұсқаларын қолданды. Кейінгі зерттеулерде MAb-резистентті вирус нұсқаларының G гликопротеиніндегі аминқышқылдық алмастыруларды талдау арқылы антигендік детерминанттардың орналасуы нақтыланды [31]. G гликопротеинінің белгілі антигендік орындары 2-суретте көрсетілген. Осы ерекшеліктеріне байланысты RABV-G гликопротеині вирусқа қарсы иммундық жауаптың негізгі нысанасы және бейтараптандырушы антиденелерді алу үшін перспективалы антиген болып табылады.

Осы бес құрылымдық ақуыздың өзара әрекеттесуі құтыру вирусының репликациясы, жиналуы және жетілген вириондардың қалыптасуы үшін қажет (2-кесте).

2-кесте - Құтыру вирусының құрылымдық ақуыздары [17]

Белок	Ұзындығы, а.қ.	Молекулалық массасы, кДа	Қызметі	Сілтеме
Нуклеопротеин (N-ақуызы)	450	55	Репликация мен транскрипция процесстерін бақылайды	[26]
Матрикстік ақуыз (M-ақуызы)	202	26	Гликопротеин мен нуклеокапсид арасындағы байланысты қамтамасыз етеді	[26,32]
Фосфопротеин (P-ақуызы)	297	33	Вирустық транскрипция және репликацияның инициациясына қатысады	[26]
РНҚ-ға тәуелді РНҚ полимераза (L-ақуызы)	2142	190	Вирус геномының транскрипциясына қатысады	[32]
Гликопротеин (G-ақуызы)	505	67	Антиденелер түзілуін индукциялайтын негізгі беткі ақуыз	[33]

1.2 Құтыру вируының патогенезі

Құтырудың адамға жұғуының ең жиі кездесетін жолы – вирус жұқтырған жануардың тістеуі немесе тырнауы болып табылады [32]. Тістеу арқылы жұғу қаупі тырнауға қарағанда кемінде 50 есе жоғары. Инкубациялық кезең жарақат кезінде организмге енген вирустың мөлшеріне байланысты 5 күннен бірнеше жылға дейін созылуы мүмкін, алайда көп жағдайда 2–3 айды, сирек жағдайда 1 жылдан астам уақытты құрайды [24]. Аурудың клиникалық ағымы бес кезеңге

бөлінеді: инкубациялық кезең, продромальды кезең, жедел неврологиялық кезең, кома және өлім [25,26]. Адамдарда құтыру ауруы энцефалиттік немесе паралитикалық түрде байқалады.

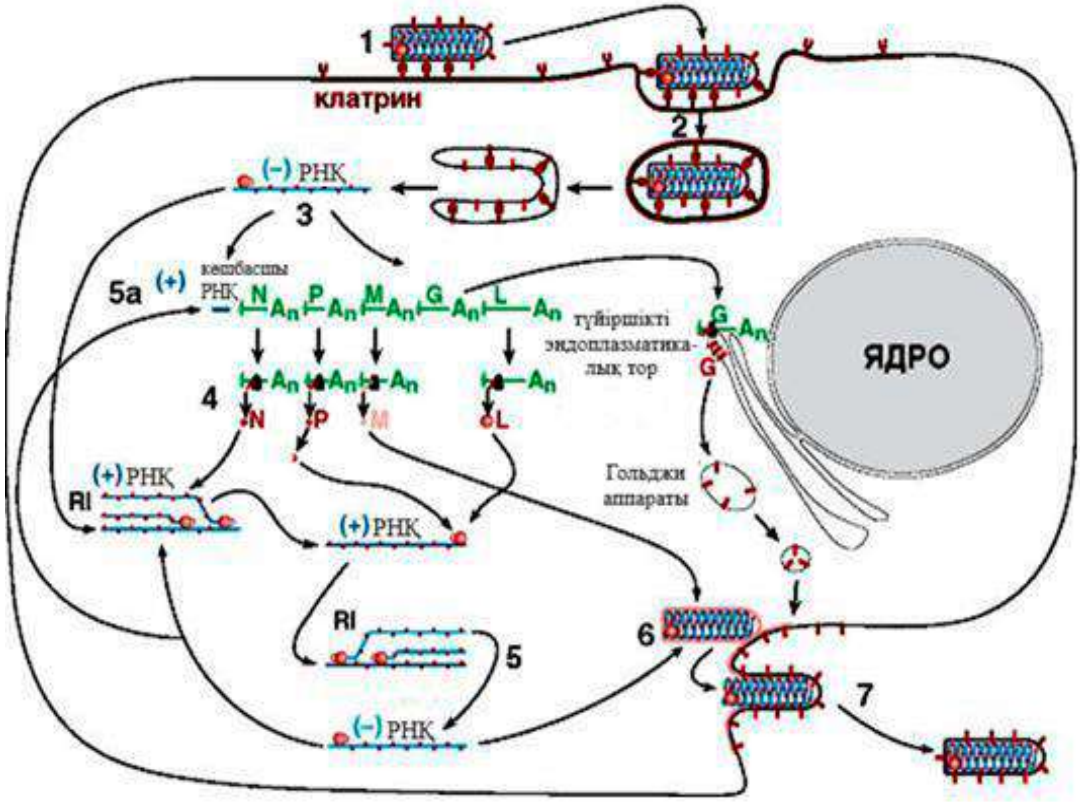
Құтыру вирусы рецепторлармен байланысқаннан кейін эндосомалық жол арқылы қожайын жасушасына енеді. Эндосома ішіндегі төмен pH әсерінен вирустық қабық пен эндосомалық мембрананың қосылуы жүзеге асып, вирустық РНҚ цитозолға босап шығады. Бұл процесте G гликопротеині рецепторлармен байланысу мен мембраналардың қосылуын қамтамасыз ететін негізгі құрылымдық белок болып есептеледі [27]. Вирустың транскрипциясы мен репликациясы цитоплазмадағы маманданған құрылымдар – Негри денешіктерінде (вирус фабрикаларында) жүреді [28]. Вирион құрамында спираль тәрізді рибонуклеопротеин кешенін (РНП) М ақуызы қоршап жатады. Ол инкапсидтелген геном мен жасуша мембранасына ендірілген G ақуызының цитоплазмалық домені арасындағы өзара әрекеттесуді қамтамасыз етеді. Инфекцияланған жасушада РНП цитоплазмаға шыққаннан кейін Р және L ақуыздары транскрипцияны бастайды. Бұл процесс геномның 3'-соңында орналасқан жалғыз полимераза байланысу аймағынан іске қосылады.

Құтыру вирусының транскрипциясы үзік-үзік сипатта жүреді. Полимераза әрбір геннің шекарасындағы старт (кэптеу) және стоп (полиаденилдену) сигналдарын таниды. Геннің соңына жеткеннен кейін полимераза стоп-сигналда диссоциацияланып, ұзындығы 2–400 нуклеотид болатын генаралық аймақтан өтіп, келесі геннің старт-сигналына қайта байланысады. Осыған байланысты транскрипция тиімділігі геномның 3'-соңынан 5'-соңына қарай біртіндеп төмендейді және гендердің экспрессия деңгейі N> P> M>G > L ретімен өзгереді. Транскрипция нәтижесінде алдымен қысқа лидерлік РНҚ синтезделеді, кейіннен 5'-кэптелген және 3'-полиаденилденген бес вирустық мРНҚ түзіледі. Бұл мРНҚ-лар қожайын жасушасының трансляциялық аппараты арқылы аударылып, вирустық белоктардың синтезін қамтамасыз етеді. L ақуызы мРНҚ-ның кэптелуі мен полиаденилденуіне қатысады. Ол жеті-сегіз уридин (U) қалдығынан тұратын қысқа тізбекпен байланысып, полиаденин (polyA) құйрығының түзілуін қамтамасыз етеді.

Құтыру вирусының вирионы алдымен жасуша иесінің рецепторына байланысады және кейін жасуша иесінің мембранасы арқылы эндоцитоз механизмі арқылы жасуша ішіне өтеді. Вирион қабықшасының эндосомалық мембранамен pH-тәуелді қосылуынан кейін капсид босап шығады, жеке гендер транскрипцияланады, ал вирус геномы репликацияланады. Барлық вирус белоктары цитозольде трансляцияланады, тек G ақуызы ғана кедір-бұдыр эндоплазмалық ретикулум және Гольджи аппараты арқылы синтезделіп, секреторлық жолмен плазмалық мембранаға жеткізіледі (3-сурет) [29].

Полимеразаның транскрипция режимінен репликация режиміне көшуін қамтамасыз ететін нақты вирустық немесе жасушалық факторлар әлі толық анықталмаған. Дегенмен, цитоплазмадағы N ақуызының концентрациясы бұл үдерісте маңызды рөл атқарады: ол жаңадан түзілетін антигеномдар мен геномдардың инкапсидациясын жеңілдетеді. М ақуызы да мРНҚ

транскрипциясынан толық өлшемді антигеномдардың репликациясына ауысуға қатысатыны көрсетілген. Репликация кезінде түзілетін оң тізбекті антигеномдар синтез барысында N ақуызымен бірден қапталып, кейін теріс тізбекті геномдардың түзілуіне матрица қызметін атқарады. РНҚ-ның жылдам инкапсидациясы вирустық геномдардың деградациясын және олардың туа біткен иммунитет сенсорларымен танылуын болдырмайды. Жаңадан қалыптасқан РНП плазмалық мембранаға бағытталып, вириондардың бүршіктеніп шығуына қатысады. Бұл үдерісте М ақуызы РНП-ны иесі-жасуша мембранасына бекітуде және вириондардың шығуында шешуші рөл атқарады. Ал G гликопротеині тример түзіп, мембранадан шығып тұратын шиптерді қалыптастырады және олар бүршіктенген вириондардың құрамына енеді [30,31].

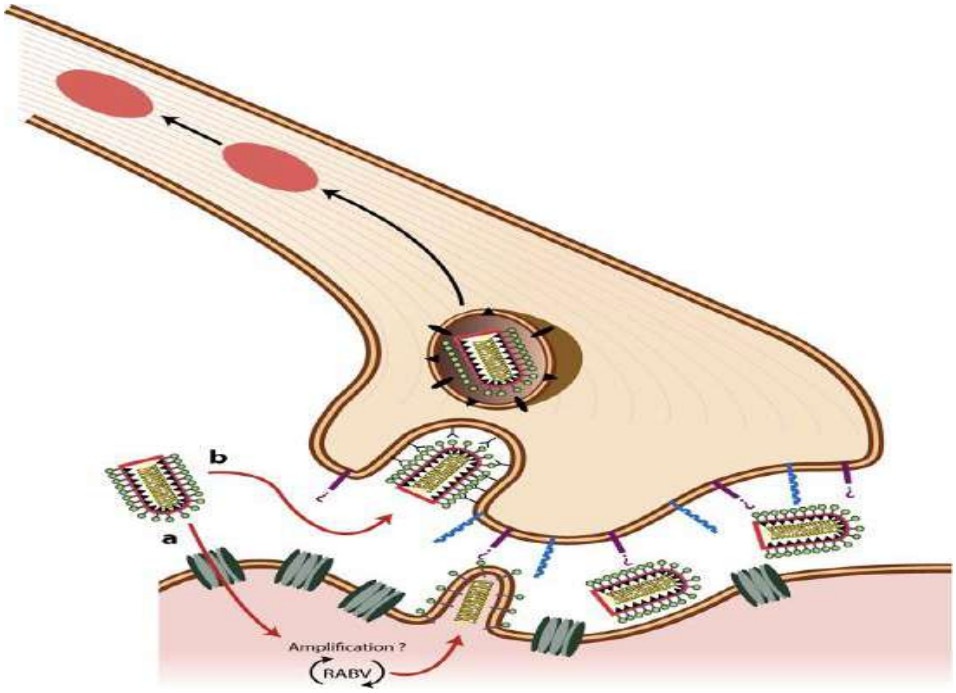


3-сурет- Құтыру вирусының (RABV) тіршілік циклі [33]

Вирустың жасушаға енуі мен инфекциялық процестің басталуында G гликопротеині шешуші рөл атқаратындықтан, ол құтыру вирусына қарсы бейтараптандырушы антиденелердің негізгі нысанасы болып табылады. Осыған байланысты қазіргі таңда G гликопротеині вакциналар мен наноантиденелерді әзірлеуде перспективалы молекулалық нысана ретінде қарастырылады [34].

Табиғи инфекция кезіндегі құтыру вирусының нейроинвазиясы жүйке бұлшықет синапсындағы синаптикалық саңылау арқылы жүреді. Бұл туралы алғашқы сенімді дәлелдер RABV мен nAchR арасындағы ақуыз-ақуыздың өзара әрекеттесуі анықталған кезде алынды, бұл nAchR-ді RABV-дің алғашқы белгілі

жасушалық рецепторы етті [19,35]. nAchR - жүйке-бұлшықет синапсының постсинаптикалық мембранасында орналасқан перифериялық жүйке жүйесіндегі кең таралған рецептор [36]. NAchR мен RABV арасындағы өзара әрекеттесудің ашылуы иммунофлуоресценция және электронды микроскопия деректерімен расталды, олар *in vivo* жағдайында жүйке-бұлшықет синапсында RABV тұрақты локализациясын көрсетті [37]. nAchR постсинаптикалық бұлшықет мембраналарында орналасқан және бұл RABV нейроинвазияға дейін бұлшықеттерде жергілікті репликация стратегиясын сақтайтынын көрсетеді. Жүйке-бұлшықет түйініндегі вирус концентрациясы вирустың орталық жүйке жүйесіне ену ықтималдығын арттыруы мүмкін. Бұл табиғи RABV инфекциясының ұзақ инкубациялық кезеңдерін де түсіндіруі мүмкін, оның барысында бұлшықет жасушаларында жасырын кезең немесе RABV аз репликация кезеңі орын алуы мүмкін [38].



4-сурет- Құтыру вирусының (RABV) нейроинвазивтік стратегиясы [19]

4-суретте эксперименттік тұрғыда расталған екі ықтимал механизм көрсетілген. (а) Құтыру вирусының гликопротеині (RABV-G) никотиндік ацетилхолин рецепторымен (nAchR, жасыл түспен көрсетілген) өзара әрекеттесіп, бұлшықет жасушаларына енуін қамтамасыз етеді. Нәтижесінде вирус жергілікті деңгейде репликацияланып, кейін жүйке-бұлшықет түйіскісінің синапстық саңылауына өтеді. (б) Баламалы механизмде RABV-G нейрондағы бірнеше жасушалық рецепторлардың бірімен, мысалы, NCAM (күлгін) немесе p75NTR (көк) рецепторымен байланысады. Бұл жағдайда вирус бұлшықеттегі алдын ала жергілікті көбеюсіз тікелей нейронға ене алады [19].

Балапандардың жұлын және бұлшықет культураларында тұрақты бақылау инфекциясы бар құтыру вирусының стандартты штаммымен жүргізілген

зерттеулер жүйке-бұлшықет түйіні нейрондарға негізгі ену орны екенін көрсетті [39]. Перифериялық нервтерден ОЖЖ-ге тасымалдау 8-20 мм/тәулік тұрақты жылдамдықпен жүреді және уақыт ОЖЖ-дан егу орнының қашықтығына байланысты [40].

Вирус орталық жүйке жүйесіне жеткеннен кейін тез таралады. Клиникалық көріністеріне немесе тістеген жеріне қарамастан, құтыру вирусы ең алдымен ми бағанасында, таламуста, базальды ганглийлерде және жұлында кездеседі. Егер қарқынды терапия болмаса, өлім клиникалық белгілер басталғаннан кейін 7-10 күннен кейін болады. [41,42]

1.3 Құтырудың Қазақстандағы және әлемдегі таралуының қазіргі заманғы ерекшеліктері.

Қазіргі уақытта құтыру әлемнің 150-ден астам елі мен аумағында эндемиялық таралған инфекциялардың бірі болып табылады. Бұл жыл сайын шамамен 8,6 млрд АҚШ долларына тең экономикалық шығындарға және жылына 60 000-нан астам адамның қаза болуына алып келеді (олардың 96%-ы Азия мен Африка құрлығына тиесілі) [1,43]. Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымы (ДДСҰ) құтыруды әлемдегі ең өлім-жітімі жоғары әрі экономикалық зардабы ең ауқымды жұқпалы аурулардың қатарына жатқызады. Жиынтық экономикалық шығындарға жануарлардың қырылуынан келген залал, қаңғыбас жануарларды аулау, үй және жабайы жануарларды вакцинациялау, сондай-ақ диагностикалық зерттеулер жүргізу шығындары кіреді. Бұдан басқа, құтыруға шалдыққан немесе күдікті жануарлармен байланыста болған адамдарға постэкспозициялық профилактика жүргізуге, сондай-ақ профилактикалық және карантиндік іс-шараларды ұйымдастыруға жұмсалатын шығындар да есепке алынады.

Қазіргі кезде құтырудың таралуына табиғи және әлеуметтік-экономикалық факторлар елеулі ықпал етеді. Сүтқоректілердің барлық түрлері құтыруға бейім, дегенмен вирустың негізгі тасымалдаушылары жыртқыштар болып табылады. Оңтүстік жарты шардың қалалық аймақтарындағы қаңғыбас иттер құтыру ауруының негізгі себебі болса, солтүстік жарты шарда құтыру ең алдымен орман жануарларының ауруы болып табылады [44].

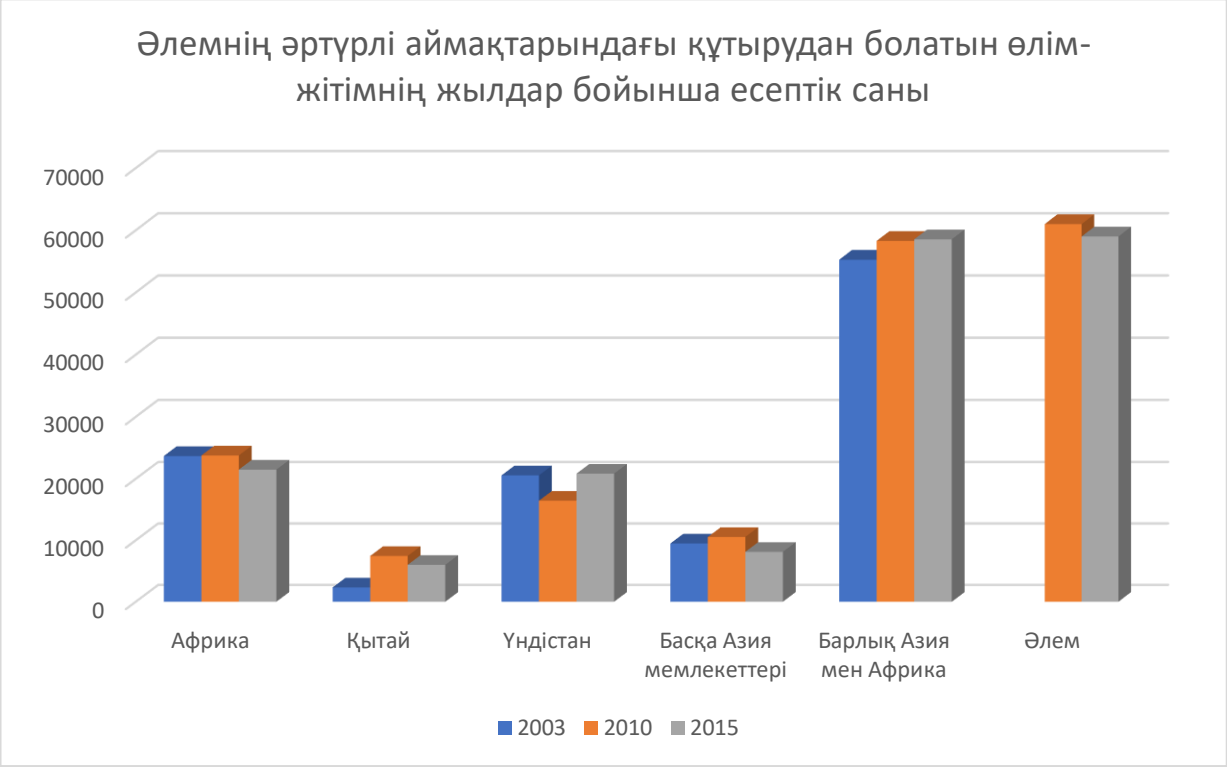
Құтыру ауруы кейбір аралдық елдерді (Австралия, Ұлыбритания, Ирландия, Жаңа Зеландия, Жапония) және Антарктиданы қоспағанда, бүкіл әлемде кең таралған. Бүгінгі күнге дейін құтыру ең қауіпті аурулардың бірі болып қала береді, ол жыл сайын 60 мыңнан астам адамның және шамамен 1 миллион жануардың өліміне себеп болады [45].

Құтыру инфекциясының әлемдік эпидемиологиялық ауыртпалығының басым бөлігі Азия аймағына тиесілі, бұл ретте ауру мен өлім-жітім көрсеткіштері бойынша Үндістан жетекші орындардың бірін алады. Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының (ДДСҰ) Оңтүстік-Шығыс Азия өңіріне кіретін 11 мемлекетінің (Бангладеш, Бутан, Корей Халық Демократиялық Республикасы, Үндістан, Индонезия, Мальдив аралдары, Мьянма, Непал, Шри-Ланка, Таиланд және Тимор-Лесте) сегізінде құтыру инфекциясы эндемиялық сипатта сақталуда.

Аймақта 1,4 миллиардтан астам адам құтыруды жұқтыру қаупіне ұшырайды және жаһандық құтырудан қайтыс болғандардың шамамен 45% Азияға сәйкес келеді [17, 46].

Құтыруды бақылау бойынша табысты тәжірибелер Азияның бірқатар елдерінде байқалады. Жапония, Сингапур және Тайваньда бұл инфекцияның таралуы тоқтатылған. Ал Сингапур мен Малайзия мысалдары иттер арасында таралатын құтыруды кешенді профилактикалық шаралар арқылы жоюға болатындығын көрсетті. Аталған елдерде міндетті тіркеу, вакцинациялау бағдарламалары және ит популяциясын басқару жүйелері негізгі бақылау тетіктері ретінде қолданылды [47].

Африканың үлкен аумағында иттердің құтыру ауруы тіркеліп, адамдарға және ауылшаруашылық жануарларына нақты қауіп төндіреді. Африкада жыл сайын шамамен 25000 адам құтырудан қайтыс болады, әр 20 минут сайын шамамен 1 адам қайтыс болады (5- сурет). Балалар бұл аурудан ең көп зардап шегеді: әрбір 10 өлімнің 4-і 15 жасқа дейінгі балаларға келеді [48].



5-сурет- Дүниенің әртүрлі аймақтарындағы құтырудан болған өлім-жітімнің есептік саны (95 % сенімділік интервалымен) (*Орталық Азия елдерін қоспағанда) [17, 49] (автордың өзінің құрастырғаны)

Бұл деректер Азия мен Африка аймақтарында құтыруға қарсы профилактикалық іс-шараларды күшейтудің қажеттілігін көрсетеді. Сонымен қатар құтырудың таралуы әлеуметтік-экономикалық факторлармен, денсаулық сақтау жүйесінің қолжетімділігімен және халықтың хабардарлық деңгейімен тығыз байланысты екенін көрсетеді [50].

Өткен ғасырда Еуропада құтыру ауруында айтарлықтай өзгерістер болды. Кейбір Еуропа елдері үй жануарларын вакцинациялау және қасқырлар мен қаңғыбас иттерді жою арқылы ит құтыруын жойды және қазір олардан толықтай құтылды. Алайда, 20 ғасырдың ортасында құтыру вирусы түлкілерге бейімделген кезде қызыл түлкілер құтырудың негізгі иесі, резервуары және тасымалдаушысы болды. Нәтижесінде құтыру ауруының жаңа табиғи ошақтары пайда болды. Еуропада түлкі құтыруының таралуын болдырмау үшін екі стратегияны қамтитын түлкі құтыруымен күресу науқаны басталды: түлкілерді жою және оральды вакцинациялау. Әртүрлі тәсілдерді салыстырғаннан кейін оральді вакцинациялау түлкі популяциясы өсіп жатқан орталарда құтыруды жоюда тиімді екені анықталды [51].

Еуропалық Одақтың 2020 жылға арналған мақсаты үй және жабайы жануарлар арасында құтыруды толық жою болды. Алайда 2020 жылы Польша мен Румынияда құтырудың тіркелуі бұл инфекцияның ЕО-ның шығыс бөлігінде әлі де таралуын жалғастырып отырғанын дәлелдеді. [17, 52]

Адамның құтыруы Қазақстан халқының денсаулығына елеулі қауіп төндіреді. Эпидемиологиялық зерттеулер Қазақстанда құтырудың жануарлар арасында таралған энзоотиялық ошақтары негізінен елдің солтүстік және оңтүстік-шығыс өңірлерінде орналасқанын көрсетті. Құтырудың ең көп расталатын жағдайлары ірі қара малда, иттерде және түлкілерде тіркелді. 2007–2011 жылдары адамдар арасында құтырудың 44 жағдайы тіркеліп, жыл сайын орта есеппен 9 адам қайтыс болған. Иттердің қабу жиілігі 2010 жылы миллионға шаққанда 3700 және 2011 жылы миллионға шаққанда 4130 құрады. Экспозициядан кейінгі профилактиканы 2009 жылы 57000 адам, 2010 жылы 59000 және 2011 жылы 67000 адам алды [53]. Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігінің мәліметі бойынша, 2025 жылы елімізде өліммен аяқталған құтырудың 3 жағдайы тіркелген, ал 2024 жылы мұндай жағдайлар анықталмаған. Жануарлардың тістеуі, тырнауы немесе сілекейінің жұғуына байланысты 2025 жылы 60 153 адам, ал 2026 жылдың бірінші тоқсанында 14 134 адам медициналық көмекке жүгінген [2]. Қазақстан аумағында құтырудың табиғи ошақтары сақталған және жануарлар арасында ауру жағдайлары тіркеліп отырады [3].

Қазақстанда құтыру проблемасы шешілмеген күйінде қалып отыр, аурудың табиғи ошақтары үнемі тіркеліп отырады, бұл құтырудың алдын алу және оған қарсы күрес шараларының тиімділігін арттыруды талап етеді. Құтыру ауруының алдын алу үшін Қазақстанның ауру тіркелген барлық аймақтарында ірі қара, қой, ешкі, жылқы, түйе, ит және мысықтарға жыл сайынғы жоспарлы егу жұмыстары жүргізіледі [17, 54].

Құтыру ауруының әлемдік деңгейде кең таралуы және оның жоғары әлеуметтік-экономикалық зардаптары Қазақстан үшін де өзектілігін жоғалтпаған күрделі мәселе болып саналады. Сондықтан еліміздегі эпизоотиялық және эпидемиологиялық жағдайды қарастыру ерекше маңызға ие.

2012 жылы тірі вакцина сіңдірілген жемдерді қолдану арқылы жабайы жануарларды вакцинациялау бағдарламасы басталды. Вакцинаның жалпы

дозаларының саны, түрлері мен қолданылуы аймақтағы мал басының көлеміне байланысты. Бұл көрсеткіш белгілі бір өңірге тән эпидемиологиялық жағдайға сүйене отырып есептеледі. Жоғары қауіп аймақтарында қазіргі саясат барлық малды вакцинациялауды, үй және қаңғыбас иттер мен мысықтарға тұрақты мониторинг жүргізіп, вакцина егуді қамтиды [55].

Қазіргі кезде елімізде жабайы жануарлар арасында оральді вакцинаны кеңінен таратуға бағытталған шаралар жүзеге асырылуда. Орташа қауіп аймақтарында соңғы үш жыл ішінде құтыру тіркелген жерлерде жергілікті вакцинация жүргізіледі, сондай-ақ үй және жабайы жыртқыш жануарларға мониторинг жасалып, жабайы жануарлар арасында вакцинаны жергілікті тарату қарастырылады. Төмен қауіп аймақтарында, яғни құтыру жағдайлары тіркелмегенімен, ықтималдығы бар өңірлерде барлық жануар түрлері арасында құтыруға тұрақты мониторинг жүргізіледі және үй мен жабайы жыртқыш жануарларды бақылау жүзеге асырылады. Өте төмен қауіп аймақтарында, құтыру тіркелмеген әрі пайда болу ықтималдығы аз деп саналатын өңірлерде эпидемиологиялық скрининг пен мониторинг шектеулі көлемде ғана жүргізіледі [54,56].

Құтырудың кең таралуы, жоғары өлім-жітімі және елеулі экономикалық шығындары бұл инфекцияны бақылау мен алдын алудың тиімді әдістерін әзірлеудің маңыздылығын көрсетеді.

1.4 Антирабиялық емдік препараттар: жетістіктері мен болашағы

1.4.1 Құтыруға қарсы вакциналар

Қазіргі уақытта құтырудың клиникалық белгілері пайда болғаннан кейін ауруды тиімді емдеуге мүмкіндік беретін арнайы фармакологиялық терапия жоқ. Осыған байланысты клиникалық симптомдары дамыған құтыру жағдайлары өліммен аяқталады. Құтыру вирусымен ықтимал байланыстан кейін жүргізілетін постэкспозициялық профилактика (ПЭП) инфекцияның дамуын болдырмаудың тиімді әдісі болып табылады. ПЭП құтыруға күдікті жануармен байланыс болған жағдайда жүргізіледі [57].

Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының (ДСҰ) ұсынымдарына сәйкес ПЭП-тің негізгі құрамдас бөліктеріне құтыруға қарсы вакцинамен иммундау және көрсетілім болған жағдайда құтыруға қарсы иммуноглобулинді қолдану жатады. Вакцинация нәтижесінде спецификалық гуморальдық иммундық жауаптың қалыптасуына белгілі бір уақыт қажет. Осы кезеңде пассивті иммундық қорғанысты қамтамасыз ету мақсатында III санаттағы экспозициялар кезінде құтыруға қарсы иммуноглобулин ПЭП құрамына енгізіледі. Иммуноглобулин құрамында дайын антирабиялық антиденелер болғандықтан, оның әсері вакцина нәтижесінде белсенді иммундық жауап қалыптасқанға дейінгі кезеңде жедел пассивті қорғанысты қамтамасыз етеді [58].

Құтыруға қарсы вакциналар адамдарда инфекцияның алдын алуда жоғары тиімділік көрсетеді. Вакцинация ПЭП-тің негізгі компоненті болып табылады және барлық жас топтарында қолдануға жарамды.

Құтырудың алдын алуда адамдарды вакцинациялаумен қатар, жануарларды иммундаудың да маңызы зор. Әсіресе иттерді жаппай вакцинациялау адамдар арасында құтырудың таралуын төмендетудің негізгі профилактикалық шараларының бірі болып саналады. Иттер құтыру вирусының адамдарға берілуіндегі негізгі эпидемиологиялық көздердің бірі болғандықтан, жануарлар арасында вакцинация деңгейін арттыру адам денсаулығын қорғауда маңызды рөл атқарады.

Құтыруға қарсы вакциналардың даму тарихы XIX ғасырдан басталады. Құтыруға қарсы алғашқы вакцина 1885 жылы қолданылды [59]. Кейіннен вакциналарды өндіру технологиялары жетілдіріліп, олардың қауіпсіздігі мен иммуногендік қасиеттері арттырылды Қазіргі кезде құтыруға қарсы вакциналар адамның постэкспозициялық профилактикасында кеңінен қолданылады және ДСҰ-ның негізгі дәрілік заттар тізіміне енгізілген [60].

Өндіру технологиясына қарай қазіргі уақытта адамға арналған құтыруға қарсы вакциналар бірнеше топқа бөлінеді.:

1. Жасуша негізіндегі вакциналар – тауық эмбрионынан тазартылған вакцина, тазартылған Vero жасушаларында дайындалған вакцина және адамның диплоидты жасушаларында алынған вакцина;

2. Үйрек эмбрионынан алынған вакцина;

3. Жүйке тіндерінен алынған вакциналар [17, 61].

Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымы жүйке тіні негізінде өндірілетін құтыруға қарсы вакциналарды қолдануды ұсынбайды. Бұл вакциналардың қолданылуы неврологиялық сипаттағы ауыр жағымсыз реакциялардың даму қаупімен және жасуша өсінділері негізіндегі заманауи вакциналармен салыстырғанда иммуногенділігінің төмен болуымен байланысты.

Адамның диплоидты жасушаларына негізделген құтыруға қарсы вакцина (HDCV) алғаш рет 1967 жылы әзірленді. Адамның диплоидты жасушаларына негізделген құтыруға қарсы вакциналар питман-мур вирусының әлсіреген штаммы арқылы жасалған инактивацияланған вакциналар болып табылады [62]. Осы әзірлемелерден басқа, тауық эмбрионының тазартылған жасушаларына (CCEEV) негізделген жаңа және өндірістік шығыны төмен вакциналар және ДДҰ-ның ұсынымдарына сәйкес келетін Vero жасушаларына негізделген құтыруға қарсы тазартылған вакциналар қазіргі уақытта қолданылады [17, 57].

Тазартылған тауық эмбриону жасушалары негізіндегі вакциналар (CCEEV) де құтырудың алдын алуда қолданылатын жасуша өсінділеріне негізделген препараттардың бірі болып табылады. Бұл вакциналарды преэкспозициялық және постэкспозициялық профилактика мақсатында қолдануға болады. CCEEV өндірісінде құтыру вирусы тауық эмбриону жасушаларында өсіріліп, кейін

инактивацияланады және тазарту сатыларынан өткізіледі. Құрамындағы инфекциялық қабілетінен айырылған вирус бөлшектері организмде құтыру вирусына қарсы спецификалық иммундық жауаптың қалыптасуын ынталандырады. Бұл вакциналар адамдарда құтырудың алдын алуда қауіпсіз әрі тиімді деп саналады [17, 63].

Кері генетика технологиясының дамуы теріс мағыналы бір тізбекті РНҚ вирустарының молекулалық биологиясын зерттеудің жаңа мүмкіндіктерін қалыптастырды. Бұл әдіс қазіргі кезде RABV патогенезінің молекулалық механизмдерін зерттеуде және жаңа вакциналық кандидаттарды әзірлеуде маңызды эксперименттік құрал ретінде пайдаланылады. Репликациясы шектелген немесе репликацияға қабілетсіз рекомбинантты RABV конструкциялары дәстүрлі инактивтелген вакциналарға балама вакциналық платформалардың бірі ретінде қарастырылады. Олардың негізгі артықшылықтарының бірі — вирустың патогенділігін төмендету арқылы қауіпсіздік сипаттамаларын жақсарта отырып, спецификалық иммундық жауап қалыптастыру мүмкіндігі.

Моримото және әріптестері P гені жойылған рекомбинантты RABV-дің арнайы комплементтеуші жасуша желісінде тиімді көбейе алатынын көрсетті. Зерттеу нәтижесінде аталған вирус ересек тышқандарда, соның ішінде миға енгізу жағдайында да, айқын патогенділік тудырмаған. Сонымен қатар, P гені жойылған рекомбинантты вирус жануарларда құтыру вирусына қарсы жоғары титрлі бейтараптандырушы антиденелердің қалыптасуын ынталандырып, оларды CVS штамының летальді әсерінен қорғаған [64].

Макгеттиган және әріптестері әзірлеген M гені жойылған, репликацияға қабілетсіз рекомбинантты RABV вакцинасы иттерге жүргізілген зерттеулерде қолайлы қауіпсіздік бейінін және жоғары иммуногенділікті көрсетті. Вакцинациядан кейін вирусқа қарсы бейтараптандырушы антиденелердің жылдам қалыптасқаны байқалды, ал зерттеу барысында айқын жергілікті және жүйелік жағымсыз реакциялар тіркелмеген [17, 65].

Осы нәтижелер P және M гендерінің мақсатты делециясы арқылы алынған рекомбинантты RABV конструкцияларының вакциналық платформалар ретінде перспективалы негіз бола алатындығын көрсетеді. Кері генетика технологиясы мұндай вирустық кандидаттарды мақсатты түрде құрастыруға және олардың қауіпсіздік, иммуногендік және қорғаныш қасиеттерін эксперименттік тұрғыдан бағалауға мүмкіндік береді.

Құтыруға қарсы вакциналарды әзірлеу және жетілдіру құтыру вирусының G гликопротеинінің құрылымы мен қызметін зерттеумен тығыз байланысты. Бұл ақуыз вирионның жалғыз беткі ақуызы болып табылады, жасуша рецепторларымен байланысуды қамтамасыз етеді және вирустық және жасуша мембраналарының қосылуын қамтамасыз етеді. Сонымен қатар, G ақуызы вирусты бейтараптандыратын антиденелердің негізгі индукторы болып табылады, сондықтан ол рекомбинантты және суббірлік вакциналарды әзірлеудегі басты антиген ретінде қарастырылады. Эксперименттік зерттеулер RABV-G негізіндегі иммундық жауаптың жануарларды инфекциядан қорғауға

қабілетті екенін көрсетті. Вирустық гендерге мақсатты мутация енгізу немесе оларды делециялаумен қатар, рекомбинантты вакциналық кандидаттардың қасиеттерін жақсарту үшін бірқатар қосымша генетикалық стратегиялар қарастырылуда. Олардың қатарына проапоптотикалық және вирусқа қарсы әсер ететін гендерді енгізу, қабыну цитокиндерінің экспрессиясын реттеу, сондай-ақ вирустық гендердің қосымша көшірмелерін енгізу жатады. Мұндай тәсілдер вирустың антигендік қасиеттерін күшейтіп, организмде қалыптасатын иммундық жауаптың тиімділігін арттыруға бағытталған.

Вирустық гендерге мақсатты мутация енгізу немесе оларды делециялаумен қатар, рекомбинантты вакциналық кандидаттардың қасиеттерін жақсарту үшін бірқатар қосымша генетикалық стратегиялар қарастырылуда. Олардың қатарына проапоптотикалық және вирусқа қарсы әсер ететін гендерді енгізу, қабыну цитокиндерінің экспрессиясын реттеу, сондай-ақ вирустық гендердің қосымша көшірмелерін енгізу жатады. Мұндай тәсілдер вирустың антигендік қасиеттерін күшейтіп, организмде қалыптасатын иммундық жауаптың тиімділігін арттыруға бағытталған.

Réza Etessami және әріптестері [66] жүргізген зерттеуде RABV геномына G генінің қосымша көшірмесін енгізу оның экспрессия деңгейінің жоғарылауына ықпал ететіні көрсетілді. Faber және әріптестері [67] рекомбинантты SPBNGAGA вирусында G гликопротеинінің жоғары деңгейде экспрессиялануы жасушалық апоптоздың күшеюімен және вирусқа қарсы иммундық жауаптың артуымен байланысты екенін анықтады. Тао және әріптестері [17, 68] LEP штамы үшін кері генетикалық жүйе құрып, G генінің екі функционалдық көшірмесін қамтитын рекомбинантты LEP вирусын алды. Осы рекомбинантты вирус негізінде әзірленген инактивтелген вакцинаны қолдану нәтижесінде тышқандар мен иттерде вирусты бейтараптандыратын антиденелер титрі бастапқы LEP вакцинасына қарағанда жоғары болған.

Осы зерттеулер RABV G гликопротеинінің экспрессия деңгейін генетикалық жолмен арттыру вакцинаның иммуногендік қасиеттерін жақсартудың перспективалы тәсілдерінің бірі болуы мүмкін екенін көрсетеді. Алайда мұндай генетикалық модификациялардың вирустың репликациялық қасиеттеріне, патогенділігіне, қауіпсіздігіне және вакцинаны өндіру тиімділігіне әсері әрбір рекомбинантты конструкция үшін жеке бағалануы қажет.

Zhang және әріптестері құтыруға қарсы рекомбинантты вакциналық кандидат әзірлеп, онда RABV LBNSE вирусының G гликопротеинін дендритті жасушалармен нысаналы өзара әрекеттесуді қамтамасыз ететін қысқа пептидтермен біріктірді. Зерттеу нәтижесінде rLBNSE-DCCp рекомбинантты штамымен иммундаған тышқандарда вирусты бейтараптандыратын антиденелердің жоғары титрлері қалыптасқаны анықталды. Авторлар иммундық жауаптың күшеюін қабыну цитокиндерінің экспрессиясының жоғарылауымен байланыстырды. Алынған нәтижелер G гликопротеинін дендритті жасушаларға бағыттайтын пептидтермен модификациялау құтыруға қарсы вакциналардың иммуногендік қасиеттерін арттырудың перспективалы тәсілі болуы мүмкін екенін көрсетті [17, 69].

1985 жылы құтыру вирусының G гликопротеині алдын ала дайындалған липосомаларға конъюгацияланып, иммуносомалар әзірленді. Бұл иммуносомалар жануарларда вирулентті құтыру вирусына қарсы жоғары деңгейде бейтараптандырушы антиденелердің түзілуін қамтамасыз етті [70]. Кейіннен RABV ERA штамының G гені құс шешегінің (canarypox) векторына енгізіліп, репликацияға қабілетсіз вакцина-кандидат алынды. Бұл кандидат алдымен бірнеше жануар түрлерінде қауіпсіздігі мен тиімділігі сыналғаннан кейін, I фазалық клиникалық зерттеулерге енгізілді [71]. Еріктілерге жүргізілген сынақтарда вакцина құтыруға қарсы бейтараптандырушы антиденелердің түзілуін индукциялап, жеңіл жанама әсерлер көрсетті, алайда адамдардағы қауіпсіздік пен тиімділік көрсеткіштері әлі де қосымша тексеруді және жетілдіруді қажет етеді.

Зерттеулерде RABV-G ақуызын экспрессиялайтын рекомбинантты PIV5 векторы тышқандарда құтыру вирусына қарсы қорғаныш әсер көрсететіні анықталды [72]. Сондай-ақ, ERAGS вакциналық штамының G ақуызындағы N194S және R333E аминқышқылдық алмастырулары иттер мен ірі қара малда күшті вирусты бейтараптандыратын иммундық жауаптың қалыптасуына мүмкіндік берді [17, 73]. RABV-G ақуызының иммуногендік қасиеттерін пайдалануға бағытталған әртүрлі вакциналық платформалар зерттелуде. Атап айтқанда, G ақуызының эктодоменін экспрессиялайтын жасушалық жүйелер, лентинанмен модификацияланған антигендік конструкциялар, сондай-ақ ДНҚ, мРНҚ және аденовирустық векторларға негізделген вакцина-кандидаттар ұсынылған [74–75]. Алайда бұл бағыттар бойынша алынған нәтижелерге қарамастан, әзірленген препараттардың бірде-бірі I фазалық клиникалық зерттеулерден кейінгі сатыларға әлі өткен жоқ.

Осылайша, қазіргі таңда қолданылатын антирабиялық вакциналар құтырудың алдын алуда жоғары тиімділік көрсеткенімен, оларды жетілдіру бағытындағы зерттеулер жалғасуда. Әсіресе, құтыру вирусының G гликопротеиніне негізделген рекомбинантты, суббірлік және генетикалық вакциналар қауіпсіздігі мен иммуногенділігі жоғары жаңа буын биопрепараттарын әзірлеудің перспективалы бағыты болып табылады.

1.4.2 Құтыруға қарсы антирабиялық иммуноглобулиндер

Адамдарда құтырудың алдын алу мақсатында III санаттағы экспозициялар кезінде құтыруға қарсы вакцинациямен қатар антирабиялық иммуноглобулинді қолдану ұсынылады. Бұл тәсіл постэкспозициялық профилактиканың (ПЭП) маңызды құрамдас бөлігі болып саналады. Вакцинация нәтижесінде спецификалық гуморальдық иммундық жауаптың қалыптасуына белгілі бір уақыт қажет. Осы кезеңде пассивті иммундық қорғанысты қамтамасыз ету үшін антирабиялық иммуноглобулин енгізіледі. Оның құрамындағы дайын бейтараптандырушы антиденелер вакцина әсерінен белсенді иммундық жауап қалыптасқанға дейін жедел пассивті қорғаныс береді.

Пассивті иммундау мақсатында адамның антирабиялық иммуноглобулині (HRIG), жылқыдан алынған антирабиялық иммуноглобулин (ERIG), сондай-ақ жылқы антиденелерінен алынған жоғары тазартылған $F(ab')_2$ фрагменттері қолданылуы мүмкін. Бұл препараттар экспозициядан кейінгі алғашқы кезеңде жара аймағында вирусқа қарсы жергілікті пассивті қорғанысты қамтамасыз етуге бағытталған [76]. Пассивті енгізілген антирабиялық антиденелердің белсенді иммундық жауаптың қалыптасуына ықпалы болуы мүмкін. Алайда олардың клиникалық тұрғыдан вакцинамен индукцияланатын иммундық жауапқа әсері препараттың түріне, енгізілген мөлшеріне және оның енгізілу уақытына байланысты бағаланады. Антирабиялық иммуноглобулиннің организмде сақталу мерзімі оның шығу тегіне және фармакокинетикалық сипаттамаларына тәуелді. Адамның антирабиялық иммуноглобулинінің жартылай шығарылу кезеңі шамамен 21 күнді құрайды [77]. Антирабиялық иммуноглобулинді ПЭП кезінде уақытында қолданудың маңызы зор. Ол әдетте вакцинацияның алғашқы дозасымен бірге немесе ПЭП басталғаннан кейін қысқа мерзім ішінде енгізіледі. Вакцинация басталғаннан кейінгі 7 күн өткен соң антирабиялық иммуноглобулинді енгізу ұсынылмайды, себебі осы уақытқа дейін вакцинаға байланысты белсенді иммундық жауап қалыптаса бастайды [17,58].

Осы аталған кемшіліктер құтыруға қарсы иммуноглобулиндердің кеңінен қолданылуына елеулі кедергі келтіруде. Соңғы жылдары бұл мәселелерді шешу мақсатында рекомбинантты ДНҚ-технологияларына негізделген моноклоналды антиденелерді әзірлеу бағытында белсенді зерттеулер жүргізілуде. Мұндай жаңа буын препараттары өндіріс тұрғысынан қолжетімдірек, қауіпсіздігі жоғары және стандартталған сапаны қамтамасыз етуге мүмкіндік береді деп күтілуде. Моноклоналды антиденелер құтыру вирусын бейтараптай алатындығына қарамастан, олардың тұрақсыздығы, молекулалық өлшемдерінің ірі болуы (150 кДа), қымбаттығы мен өндіріс процесінің техникалық тұрғыдан күрделілігі, сондай-ақ тіндерге төмен өткізгіштігіне байланысты тиімділігінің шектеулілігі бірқатар мәселелер туындатады [78]. Тек ауыр тізбектен тұратын антиденелердің (HCAbs) ашылуы, олардың табиғи түрде тек түйе тұқымдастарында кездесуі, жоғары арнайылығы бар антиденелер инженериясында жаңа дәуірдің басталуына негіз болды [79].

Қазіргі кезде пассивті иммунизацияға қолданылып жүрген иммуноглобулиндер құтыруға қарсы вакцинамен иммундаудан өткен жылқылардың (ERIG) немесе адамдардың (HRIG) сарысуынан алынады. Олар құтыру вирусына қарсы жедел пассивті иммундық қорғаныс қамтамасыз етіп, вакцина әсері толық қалыптасқанға дейін организмді қорғауға мүмкіндік береді. Әсіресе, олардың жоғары құны, шектеулі өндірісі және кейбір жағдайларда жағымсыз реакциялардың даму қаупі жаңа терапиялық тәсілдерді іздестіру қажеттілігін арттырады. Қолданыстағы иммуноглобулиндердің негізгі артықшылықтары мен кемшіліктері 3-кестеде берілген.

3-кесте – Құтыруға қарсы иммуноглобулиндерді қолданудың негізгі шектеулері және олардың себептері [76]

Шектеулер	Себебі
Жоғары құны мен қолжетімділіктің шектеулілігі	Өндірісінің күрделілігі мен жоғары құнына байланысты hRIG көптеген елдерде тапшылыққа ұшырап, төмен және орта табысты елдер үшін қолжетімсіз болып қалуда.
Жануар текті иммуноглобулиндердің қауіпсіздік мәселелері	eRIG салыстырмалы түрде арзан болғанымен, ол иммуногенділігі жоғары және жиі аллергиялық реакциялар туындатады. Ауыр анафилаксиялық жағдайлар да сипатталған. Бұл оның клиникалық қолданылуын шектейді.
Өндіріс пен сапаны бақылау күрделілігі	Плазмадан алынатын иммуноглобулиндердің сапасы донорлық материалға тәуелді және вирустар мен басқа патогендердің берілу қаупін толықтай жою мүмкін емес. Бұл жағдай халықаралық регламенттерге сай қатаң биологиялық қауіпсіздік шараларын талап етеді.
Енгізу ерекшеліктері	Иммуноглобулиндер міндетті түрде жара аймағына және оның айналасына енгізілуі тиіс. Бұл процедура техникалық тұрғыда күрделі, әсіресе терең немесе көпше жарақат алған науқастарда толық көлемде енгізу мүмкін болмайды.
Қысқа мерзімді қорғаныс	Иммуноглобулиндер тек уақытша пассивті иммунитет қалыптастырады және ұзақ мерзімді қорғауды қамтамасыз ете алмайды. Сондықтан оларды міндетті түрде вакцинамен біріктіріп қолдану қажет.

1.5. Наноантиденелердің құрылымы және ерекшеліктері

Наноантиденелер (VHH) — түйе тұқымдас жануарларда кездесетін ауыр тізбекті антиденелердің антигенді байланыстыратын вариабельді домендерінен алынатын бірдоменді молекулалар. Классикалық иммуноглобулин G (IgG) екі ауыр және екі жеңіл тізбектен құралса, Camelidae тұқымдасы өкілдерінің иммундық жүйесінде жеңіл тізбектері болмайтын функционалды ауыр тізбекті антиденелердің ерекше класы қалыптасқан [80–82]. Мұндай антиденелердің құрамында антигенді тануға жауап беретін VHH домені және екі тұрақты домен болады. Осы құрылым VHH доменінің жеке молекула ретінде антигенмен жоғары спецификалық байланыс түзуіне мүмкіндік береді [83].

Ауыр тізбекті антиденелер алғаш рет 1993 жылы Hamers-Casterman және әріптестері жүргізген зерттеулер нәтижесінде сипатталды. Авторлар түйе сарысуында жеңіл тізбектері жоқ, бірақ антигенді байланыстыру қызметін сақтайтын иммуноглобулиндердің бар екенін көрсетті [84]. Кейінгі зерттеулер

бұл антиденелердің қалыптасуы ауыр тізбектің бірінші тұрақты CH1 доменінің болмауымен және VHH бетінің құрылымдық қайта ұйымдасуымен байланысты екенін көрсетті [85,86]. Нәтижесінде VHH домені жеңіл тізбекпен байланысуды қажет етпейтін дербес антигенбайланыстырушы құрылым ретінде қызмет атқара алады.

Camelidae тұқымдасының әртүрлі өкілдерінде ауыр тізбекті антиденелердің үлесі бірдей емес. Олардың сарысудағы мөлшері жануардың түріне және иммуноглобулин изотипіне байланысты өзгеруі мүмкін [87–89]. Түйе тұқымдас жануарлардың ауыр тізбекті антиденелері классикалық иммуноглобулиндермен қатар гуморальдық иммундық жауаптың қалыптасуына қатысады. Бұл молекулалардың құрылымдық ерекшеліктері оларды антигендердің классикалық антиденелер үшін қолжетімділігі төмен аймақтарын тануға бейімдейді Camelidae тұқымдасы өкілдерінің сарысуындағы HcAb мөлшері түріне қарай әртүрлі болуы мүмкін: түйелерде HcAb концентрациясы 75%-ға дейін жетсе, ламалардың сарысуында ауыр тізбекті антиденелердің үлесі 45%-дан аспайды [90,91].

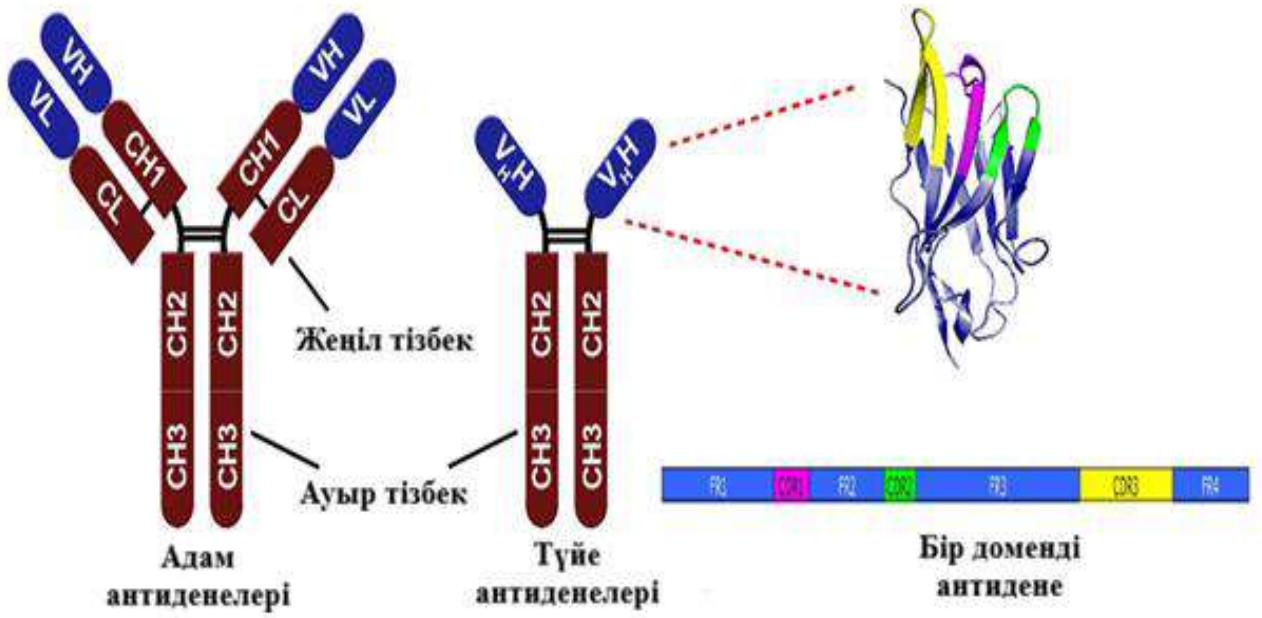
Ауыр тізбекті антиденелердің антигенмен байланысу ерекшелігі олардың вариабельді доменінің кеңістіктік ұйымдасуымен анықталады. VHH домені құрылымдық жағынан классикалық VH доменіне ұқсас болып, төрт қаңқалық аймақтан (FR1–FR4) және үш комплементарлықты анықтайтын аймақтан (CDR1–CDR3) тұрады (6-сурет) [92,93]. VHH құрылымындағы аминқышқылдық ерекшеліктер оның жеңіл тізбексіз тұрақты күйде болуына мүмкіндік береді. FR2 аймағындағы өзгерістер VH–VL өзара әрекеттесуіне қатысатын гидрофобты беткейдің қасиеттерін өзгертеді [94,95]. Бұл VHH доменінің жеке күйде еруін және функционалдық белсенділігін сақтауға мүмкіндік беретін маңызды молекулалық бейімделу болып саналады.

VHH-ның антигенді байланыстыру қасиеттеріне CDR аймақтарының, соның ішінде CDR3 ілмегінің құрылымы айтарлықтай әсер етеді. Кейбір VHH молекулаларында CDR3 салыстырмалы түрде ұзын әрі икемді болып келеді, соның нәтижесінде антиген бетінің ойыс, тар немесе классикалық антиденелер үшін кеңістіктік жағынан қолжетімсіз аймақтарын тануға мүмкіндік туады [84,85]. De Genst және әріптестері VHH молекулаларының ақуыз беттеріндегі ойыс эпитоптарды тануға бейімділігінің құрылымдық негіздерін көрсетті [96].

Тереңірек жүргізілген зерттеулер барысында Camelidae тұқымдасы өкілдерінің сарысуында иммуноглобулин G-нің үш изотипі анықталды: IgG1, IgG2 және IgG3. IgG1 150 кДа молекулалық массасы бар классикалық антидене болып саналса, қалған екі изотип қысқартылған ауыр тізбекті антиденелер түрінде кездесіп, олардың массасы шамамен 90 кДа құрайды [97]. Бұл изотиптер шарнирлік аймақтың ұзындығымен ерекшеленеді: IgG2-де ол IgG3-пен салыстырғанда әлдеқайда ұзын және кей жағдайларда CH1 доменінің қызметін атқара алады [98].

VHH доменінің екі доменнің – VL және CH1 – болмаған жағдайда да қызмет атқара алу қабілеті 1997 жылы ғалымдарды гендік инженерия әдістері арқылы алғашқы дербес рекомбинантты VHH молекулаларын жасауға итермеледі [99]. Кейіннен биофармацевтикалық Ablynx компаниясы олардың шағын көлеміне

ерекше назар аудара отырып, Camelidae тұқымдасы ауыр тізбекті антиденелерінің жеке бөлінген вариабельді домендеріне «наноантиденелер» деген коммерциялық атау берді (6-сурет). Әдебиеттерде ауыр тізбекті антидененің дербес қызмет атқаратын вариабельді домені VHH жиі «бірдоменді антидене» деп те аталады[100].



6- сурет - Классикалық IgG, ауыр тізбекті IgG және наноантидененің схемалық құрылымы [110]

Секвенирлеу деректері бойынша классикалық антиденелердің вариабельді учаскелері VH пен VHH генетикалық тізбектерінің ұқсастығы шамамен 80–85% құрайды [111], алайда гипервариабельді ілмектер мен FR2 қаңқалық аймағында белгілі бір айырмашылықтар бар. Классикалық иммуноглобулин G ауыр тізбектерінің вариабельді домендері VH-ке ұқсастығына қарай, VHH құрамынан да 4 қаңқалық (FR) және 3 гипервариабельді (CDR) аймақ ажыратылады. Наноантидене молекуласы бета-қатпарлы құрылымға ие: екі β-парақ сәйкесінше 4 және 5 β-жіпшеден құралған.

VH және VHH домендерінің қаңқалық учаскелері айтарлықтай ұқсас болғанымен, ең маңызды айырмашылық екінші қаңқалық учаскеде (FR2) байқалады. Гидрофобты аминқышқылдарының гидрофильді немесе көлемі кіші аминқышқылдарына ауысуы [112] ауыр тізбектің вариабельді аймағының жеңіл тізбектің вариабельді аймағымен байланысу қабілетін жоғалтуына алып келді. Мұндай құрылымдық өзгеріс біртізбекті антиденелердің (VHH) бірегей қасиеттерін қалыптастыруға, соның ішінде олардың ерігіштігінің жоғарылауына және тұрақты гомодимерлер түзу қабілетіне ықпал етті.

Классикалық антиденелердің ауыспалы доменімен салыстырғанда бір доменді антиденелер антигенді байланыстыру орындарының құрылымында да

айтарлықтай айырмашылыққа ие. VHH молекуласындағы H1 және H3 гипервариативті ілмектер классикалық антиденелерге қарағанда ұзағырақ. Сонымен қатар, H3 ілмегі дөңес, саусақ тәрізді ұзартуларды қалыптастыруға қабілетті, олар 60-80% жағдайларда классикалық антиденелер үшін конформациялық қолжетімсіз эпитоптармен әрекеттесу үшін жауапты [93,94]. VHH молекуласының ұзартылған пішіні және паратоптың дөңес пішіні классикалық антиденелердің «платформасымен» дерлік бірдей өлшемдері (600–800 Ао) бар антигенді байланыстыратын беттің пайда болуына әкелді [113]. Қосымша зерттеулерде анықталғандай, қосымша тұрақтандыру үшін VHH молекуласының құрамында цистеиннің қосымша қалдықтары бар, олардың арасында дисульфидтік байланыс пайда болады. Бір дисульфидті көпірдің болуы және гидрофильді аминқышқылдарының болуына байланысты агрегацияның болмауы молекуланың рефолдингіне ықпал етеді, бұл оның қолайсыз факторлардың әсерінен кейін белсенділігін қалпына келтіруге мүмкіндік береді [96].

Наноантиденелердің молекулалық массасының төмен болуы (шамамен 12–15 кДа) олардың тіндерге енуін және биологиялық нысаналарға қолжетімділігін арттырады. Бір доменді құрылымы VHH молекулаларын гендік инженерия әдістерімен оңай модификациялауға, сондай-ақ бактериялық экспрессиялық жүйелерде рекомбинантты түрде өндіруге мүмкіндік береді [114].

Қазіргі уақытта Еуропалық дәрі-дәрмек агенттігі мен АҚШ-тың Азық-түлік және дәрі-дәрмек басқармасы наноантиденеге негізделген алғашқы препаратты мақұлдады, бірақ бірнеше өнім әлі де клиникалық сынақта. Олардың құндылығы улану, инфекциялар, амилоидоз және басқа патологияларда дәлелденген [115].

Вирус бейтараптандыратын наноантиденелер көптеген мысалдармен вирустың өмірлік циклінің әртүрлі кезеңдерін үзуге қабілеті жоғары әлеуетті құнды биомолекулалар ретінде сипатталды. Құтыру вирусының гликопротеиніне қарсы бағытталған құтыруға қарсы наноденелер инфекциядан 24 сағат бұрын енгізілген кезде тышқанның өлім үлгісінде толық қорғанысты көрсетті [116]. Адам иммуноглобулині мен вакцина жұқтырған жануарды қорғай алмаған кезде, инфекциядан кейінгі бұлшықет ішіне енгізгенде де өлім-жітімнің төмендеуі байқалды [106]. Наноденелердің қан ағымынан тез шығарылуына байланысты олардың кішігірім мөлшерімен байланысты оңтайлы емес нәтижелерге әкелді деп болжануда.

Моноклоналды антиденелермен салыстырғанда, наноантиденелердің молекулалық массасы шамамен 15 кДа, яғни айтарлықтай кіші. Шағын мөлшерінің арқасында олар ағза тіндеріне жақсы еніп, біркелкі тарала алады. Алайда наноантиденелердің кіші көлемі олардың қан айналым жүйесінен тез шығарылуына әкеледі. Бұл мәселені шешу және жартылай ыдырау кезеңін ұлғайту мақсатында наноантиденелерді ерігіш молекулалармен, мысалы, қан плазмасы ақуызымен (альбуминмен), коллаген домендерімен біріктіреді [117].

4-кестеде дәстүрлі иммуноглобулиндер мен наноантиденелердің арасындағы айырмашылықтар көрсетілген.

4-кесте- Дәстүрлі антиденелер мен наноантиденелердің қасиеттері [110]

Қасиеті	Дәстүрлі IgG	VHH-наноантиденелер
Молекулалық массасы	~150 кДа	~15 кДа
Құрылымдық ұйымдасуы	2H + 2L	Бір VHH домені
Антигенмен байланысуы	VH + VL	VHH
Тіндерге таралуы	Салыстырмалы шектеулі	Жоғары
Клиренсі	Баяу	Жылдам
Тұрақтылығы	Жоғары	Жоғары

Терапиялық және зерттеу мақсаттарында наноантиденелерге өзге наноантиденелерді, қажетті молекулаларды немесе радиоактивті таңбаларды қосу арқылы оңай модификациялауға болады. Көбіне би- немесе тривалентті наноантиденелер қолданылады, олардың тиімділігі моновалентті түрлеріне қарағанда жоғары болып келеді. Қазіргі уақытта наноантиденелерді қолдану аясы өте кең: олар зертханалық зерттеулерде, нейродегенеративті, инфекциялық, гематологиялық, қабынулық және аутоиммундық аурулардың диагностикасы мен терапиясында кеңінен пайдаланылады [118].

1.6 Коллагеннің тримеризациялық құрылымдары мен олардың наноантиденелердің биологиялық тиімділігіне әсері

1.6.1 Коллаген домені және оның тримеризациядағы рөлі

Коллагендер - сүтқоректілердегі ең кең таралған ақуыздар. Коллагендер тұқымдасына құрамында кем дегенде бір үштік шиыршықты (триплексті) домені бар 28 өкіл кіреді [119]. Коллагендер жасушадан тыс матриксте жинақталып, сол жерде олардың көбі жоғары молекулалық құрылымдар түзеді. Төрт коллаген — II типті мембраналық ақуыздар болып табылады және олар сондай-ақ ерігіш формада кездеседі, яғни жасуша беті қабыршығы түскен кезде босап шығады. Коллагендер құрылымдық қызмет атқарып, тіндердің механикалық қасиеттерін, ұйымшылдығын және пішінін анықтайды. Олар әртүрлі рецепторлар тұқымдастары арқылы жасушалармен әрекеттесіп, олардың пролиферациясын, миграциясын және дифференцировкасын реттейді. Кейбір коллагендердің тіндерде таралу аймағы шектеулі болып, соған байланысты олардың биологиялық функциялары да ерекше болады.

Барлық коллаген түрлеріне ортақ өздігінен ұйымдасу кезеңі— тримеризация болып табылады. Бұл үдеріс ерекше тізбектерді таңдап, байланыстырып тіркейді, кейін олар белгілі бір жоғары құрылымдарға олигомерленеді. Тізбектің таңдалуы мен үштік шиыршықтың түзілуінің бастамасы көбіне соңғы (N- немесе C-соңғы) коллагенге жатпайтын (NC) домендермен анықталады. Фибрилл түзуші I және III типті коллагендерге жүргізілген алғашқы зерттеулер карбоксил ұшындағы NC1-домендердің тримеризация кезеңінде шешуші рөл атқаратынын көрсетті. NC1-домендер барлық коллаген кластарында тізбектерді таңдау мен тримеризацияны

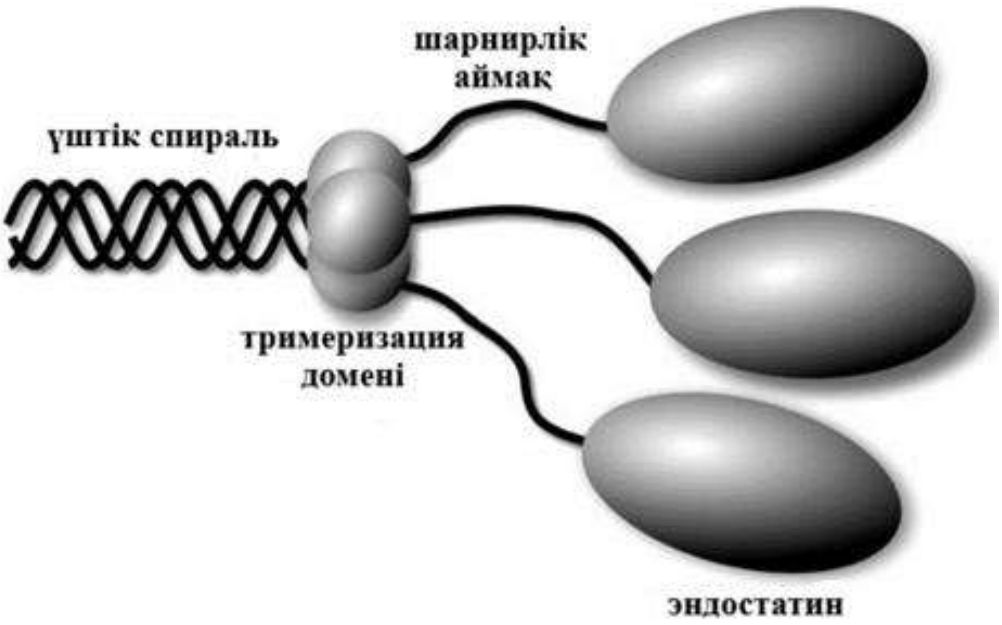
басқарады, бірақ XIII және XVII типті трансмембраналық коллагендер бұл ережеден ерекшеленеді—олардың тримеризациясы амин ұшындағы NC-домендермен реттеледі деп есептеледі. Ал IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX және XXI типті фибриллаға ассоциацияланған коллагендердің тримеризациясы, ықтимал түрде, карбоксил ұшынан санағанда екінші NC2-доменмен реттеледі. IV, VIII және X типті тор түзу коллагендердің тримеризациялық домендері кристалдандырылып, олардың атомдық құрылымдары жуырда анықталды, бұл осы типтегі коллагендердің тізбек селективтілігін егжей-тегжейлі атомдық деңгейде зерттеуге мүмкіндік берді. Басқа типті коллагендердің NC-домендерінің тримеризация механизмдерінің көптеген маңызды ерекшеліктері әлі де толық айқындалмаған [120].

1.6.2 Адамның XVIII типті коллагенінің қасиеттері

XV және XVIII типті коллагендер мультиплексиндер деп аталатын фибрилярлы емес коллагендер тобына жатады. Олардың құрылымына коллагендік емес аймақтармен үзіліп отыратын бірнеше коллагендік (COL) домендердің болуы тән. XV және XVIII типті коллагендер сәйкесінше α1(XV) және α1(XVIII) полипептидтік тізбектерінен құралған гомотримерлер түзеді. Адамның XV типті коллагенінің α1(XV) тізбегінде тоғыз коллагендік домен және олардың арасындағы сегіз негізгі коллагендік емес үзіліс болады, ал XVIII типті коллагеннің α1(XVIII) тізбегінде он коллагендік домен орналасқан [121].

Гель-хроматографияны пайдалана отырып жүргізілген бастапқы биофизикалық зерттеулер толық өлшемді рекомбинантты NC1 домені тышқанның XVIII типті коллагенінде шамамен 100 кДа тример түзетінін, ал жеке алынған эндостатин домені мономер күйінде болатынын көрсетті. NC1 доменінің протеолитикалық ыдырауы нәтижесінде белгілі бір фрагменттер, атап айтқанда тримерлік қасиетті сақтайтын 5 кДа өлшемді фрагмент түзіледі. Бұл 10–60 қалдықтарының аймағы құрылымдық тұрғыдан дербес тримеризациялық мотив түзетінін болжайды. Тізбектерді туралау және экзондарды картаға түсіру XV және XVIII типті коллагендердегі осы аймақтың жоғары консервацияланғандығын қосымша растады [122].

XVIII типті коллаген биомедициналық зерттеулерде ерекше қызығушылық тудырды, себебі оның NC1-доменінен алынған, молекулалық массасы шамамен 20 кДа болатын эндостатин фрагменті ашылды. Эндостатин айқын антиангиогендік (қан тамырларының түзілуін тежейтін) және ісікке қарсы қасиеттерге ие. XV және XVIII типті коллагендердің NC1-домендері базальды мембраналарда және айналымдағы сарысуда анықталған. Бұл домендер құрылымдық жағынан үш аймақтан тұрады: N-соңғы тримеризация домені, орталық протеазаға сезімтал "ілмек" (шарнир) бөлігі, C-соңғы эндостатин домені. XVIII типті коллагеннің карбоксил ұшының сызбалық бейнесі 7- суретте айқын көрсетілген.



7-сурет - XVIII типті коллагеннің карбоксил ұшының сызбалық бейнесі [120]

NC1 доменінің тримерлік табиғаты рекомбинантты адам XVIII типті коллагенін хроматографиялық талдау және химиялық тігу әдістері арқылы дербес расталды. Бұл тримерлену домені ақуыздық инженерия стратегияларында біртізбекті антиденелердің тримерленуін ынталандыру мақсатында табысты қолданылып, оның әмбебап құрылымдық модуль ретіндегі әлеуетін айқын көрсетеді [120,121].

Эндостатин ангиогенездің ең көп зерттелген эндогенді тежегіштерінің бірі болып табылады. Ол эндотелий жасушаларының пролиферациясы мен миграциясын тежей отырып, апоптозды индукциялау арқылы ісік өсуін басады және ұзақ мерзімді қолдану кезінде жүйелік уыттылығының төмендігімен ерекшеленеді. Ісікке қарсы тиімділіктің кейде бірізді болмауы туралы хабарланған, бұл құбылыс ақуыздың бүктелуі, жеткізу жүйелері, гепарин мен мырышқа аффинділігі сияқты факторлармен түсіндіріледі.

NC1 доменінің биологиялық әсерлері оның олигомерлік күйіне айтарлықтай тәуелді: тримерлік түрлері жасушалық миграция мен морфогенезді, сондай-ақ жасушадан тыс матрикс арқылы реттелетін процестерді қолдайды, ал мономерлік эндостатин бұл процестерге ықтимал ауторетелуші механизм арқылы тежеуші әсер етуі мүмкін [123].

1.6.3 Наноденелердің тиімділігін арттырудағы тримерлік форматтардың маңыздылығы

XVIII типті коллаген өзінің құрылымдық тұрақтылығы мен биологиялық маңыздылығының арқасында тримеризациялық қаңқа ретінде ерекше назарға ие болды. Оның NC1 домені тұрақты гомотримерлердің түзілуін қамтамасыз етеді,

бұл наноденелердің авидтілігін, сарысудағы жартылай ыдырау кезеңін және терапевтік әлеуетін арттыру үшін пайдаланылуы мүмкін.

Тримерлік наноантиденелер мономерлік түрлерімен салыстырғанда әлдеқайда төмен концентрацияларда жоғары нейтрализдеуші белсенділік көрсетеді. Коллагендік тримеризациялық қаңқа құрылымдық тұрақтылық пен наноантидене кешендерінің дұрыс бүктелуін қамтамасыз етіп, олардың микробтық экспрессиясын және вирус мутацияларына бейімделуін жеңілдетеді [124].

XVIII типті коллагеннің NC1 тримеризациялық домені наноантиденелердің функционалдық қасиеттерін жақсартуға мүмкіндік беретін перспективалы құрылымдық модуль болып табылады [125]. Оның көмегімен түзілген тримерлік наноантиденелер жоғары авидтілікпен, тұрақтылықпен және биологиялық белсенділікпен сипатталады. Бұл қасиеттер құтыру вирусының G-гликопротеиніне бағытталған наноантиденелердің бейтараптандыру қабілетін күшейтуге, олардың терапиялық тиімділігін арттыруға негіз бола алады. Сондықтан XVIII типті коллагеннің тримеризациялық доменін қолдану құтыруға қарсы жаңа буындағы рекомбинантты иммунобиологиялық препараттарын әзірлеудің перспективалы бағыттарының бірі болып саналады.

2 ЗЕРТТЕУ ОБЪЕКТІЛЕРІ МЕН ӘДІСТЕРІ

2.1 Материалдар мен құралдар

Барлық материалдар мен реагенттер, соның ішінде Фрейнд адъюванты, пероксидаза коньюгацияланған анти-Мус антиденелері (HRP) , тышқанға қарсы Мус IgG антиденелері, р нитрофенилфосфат (pNPP), тетраметилбензидин (TMB), Ficoll-paque™ plus тығыздық градиенті ортасы, M13KO7 фаг көмекшісі, TRIZOL™ реагенті, ДНҚ-ның бірінші тізбегін синтездейтін жиынтық, рестрикциялық ферменттер, Т4 ДНҚ лигаза, 2×ПТР негізгі қоспасы, Maxisorp 96 ұяшықты планшеттер, ДНҚ маркерлері, ақуыз маркерлері, HisTrap HP бағандары Sigma-Aldrich, Corning, Abcam, Thermo Scientific, Invitrogen, Cytiva және Applichem компанияларынан сатып алынды.

2.1.1 Вакцина

RHABDOVAC – жануарларға арналған құтыруға қарсы инактивацияланған сұйық вакцина. Вакцинаның құрамында Пастер вирусы (PV) вакцина штаммымен жұқтырылған үздіксіз BSR жасуша желісінің культура сұйықтығы, адъювант ретінде- сополимердің 10% көлемі және консервант ретінде 0,1 мг/мл тиомерсал бар. Вакцина бұлшықет ішіне енгізілді. Вакцина қараңғы жерде 2°C-тан 8°C-ге дейінгі температурада сақталды және тасымалданды. Жарамдылық мерзімі: 24 ай [126] .

2.1.2 Құтыру вирусы

Стандартты жұқпалы вирус CVS-11 - американдық типтік дақылдар колекциясынан (ATCC reference VR959) алынған және нәресте хомякының бүйрек (ВНК)-21 жасушаларында өсірілген вирулентті классикалық құтыру вирусы. Тышқандарға вирус егу үшін жасуша культурасының инфекциялық дозаларының 50% дозасы (CCID50) қолданылды [126].

2.1.3 Этикалық мәлімдеме

Бұл зерттеу Еуразиялық экономикалық комиссия Алқасының 2023 жылғы 14 қарашадағы № 33 клиникаға дейінгі (клиникалық емес) зерттеулерде зертханалық (эксперименттік) жануарларды пайдалану жөніндегі Нұсқаулығына сәйкес жүргізілді. Зерттеулерде жануарларды пайдаланатын немесе оларға күтім жасайтын барлық қызметкерлер қажеттілікке қарай жыл сайын оқытудан өтті. Жануарларға зерттеу жүргізу үшін «Антиген» ғылыми-өндірістік кәсіпорны» ЖШС-нің Жергілікті этикалық комитетінің 2022 жылғы 28 наурыздағы № 124 бұйрығына сәйкес қорытындысы алынды [126].

2.1.4 Жасуша линиялары

Жұмыс барысында плазмидалық ДНҚ алу үшін JM109 жасушалық желісі, сондай-ақ белок экспрессиясы үшін Rosetta(DE3)/pLysS, SHuffle, WK6 экспрессиялық штаммдары қолданылды (5- кесте).

5-кесте – Жұмыс барысында қолданылған жасуша линиялары

Бактерия штаммы	Генотиптік/ фенотиптік сипаттамалар	Өндіруші
JM109	Жоғары трансформация тиімділігімен сипатталады; рекомбинациялық белсенділіктің төмендеуі (recA1), эндонуклеаза I жетіспеушілігі (endA1), сондай-ақ көк-ақ скрининг жүргізуге мүмкіндік беретін lacZΔM15 мутациясын қамтиды.	Promega
Rosetta2 (DE3)/pLysS	Сирек кездесетін кодондарға (AGA, AGG, AUA, CUA, CCC, GGA, CGG) сәйкес келетін тРНҚ-ларды қамтиды; DE3 лизоген lacUV5 промоторының бақылауында экспрессияланатын T7 РНҚ-полимеразаны кодтайды; pLysS плазмидасы негізгі (базалық) экспрессия деңгейін төмендетеді.	Novagen
SHuffle	-BL21 штамының жетілдірілген туындысы; -Lon және OmpT протеазаларының жетіспеушілігімен сипатталады. -T1 фагына төзімді (fhuA2), сондай-ақ нитроцефинге (Nit), спектиномицинге (Spec) және стрептомицинге (Str*) төзімділікке ие.	New England Biolabs (NEB)
WK6	WK6 — супрессорлық емес штамм, тек HA-His-тегі бар Nb (нанодене) экспрессиялайды. Көк/ақ скрининг жүргізуге мүмкіндік беретін lacIq және Δ(lacZ)M15 генотиптеріне ие, бұл рекомбинантты плазмидаларды анықтаудың кең тараған әдісі болып табылады.	ATCC (Американдық типтік дақылдар коллекциясы)

2.2 Зерттеу әдістері

2.2.1 RABV-G- XVIII плазмидасын конструкциялау

Құтыру вирусының RABV-G нуклеотидтік тізбегі (NCBI қолжетімділік нөмірі GQ918139.1) c-Мус эпитопымен және адамның XVIII коллагенінің тримеризация доменімен толықтырылып синтезделді (GeneCust Europe, Дюделанж – Люксембург). Ген синтезіне дейін 73-79 және 117-125 қалдықтарын қамтитын гидрофобты аймақтар икемді GGSGG линкерімен ауыстырылды.

Сонымен қатар rRABV-GE мен XVIII коллагенді тримерлеу домені арасына AAANSGAGGSGGSSGSSDGA икемді линкер орналастырылды. Бұл тізбек pBSK II **(+)** векторынан рестрикциялық NcoI және XhoI сайттары бойынша pET-28C(+) векторына енгізіліп, әрбір геннің 3′-ұшына 6 × His-тегін кодтайтын қосымша тізбектер енгізілді.

Ұзындығы 433 аминқышқылдарынан тұратын rRABV-GE жасушадан тыс доменін кодтайтын геннің бөлігі ПТР көмегімен pBSK II -rRABV-G-XVIII-ден алынып, кейін сол рестрикция сайттары арқылы pET-28C(+) векторына клондалды. Алынған аминқышқылдарының тізбегін растау үшін барлық плазмидалар секвенирленді. Экспрессиялық векторларды көбейту үшін *E. coli* JM109 клондаушы штамм ретінде қолданылды. Позитивті колониялардан алынған плазмидалар ПТР және рестрикциялық талдау әдістерімен тексерілді.

2.2.2 Плазмидаларды бөлу

Тиісті антибиотик қосылған ортада өскен колониялар 37 ºС-та 12 сағат бойы өсірілді. Түнгі дақылдар таза микропробиркаларға көшіріліп, 13000 айн/мин жылдамдықта 2 минут центрифугаланып, үстіңгі қоректік орта қабаты алынып тасталды. Жасушалық тұнба 100 мкл №1 ерітіндіде (50 мМ глюкоза, 10 мМ EDTA, 25 мМ Tris-HCl, pH 8) ресуспензияланып, бөлме температурасында 5 минут инкубацияланды. Кейін қоспаға 200 мкл №2 ерітіндісі (0,2 Н NaOH, 1% ДСН) қосылып, пробирка бірнеше рет аударылып араластырылды және қоспа мұзда 10 минут бойы инкубацияланды. Инкубациядан соң қоспаға алдын ала - 20 ºС-қа дейін салқындатылған 150 мкл №3 ерітіндісі (100 мл құрамында: 60 мл 5 М калий ацетаты, 11,5 мл мұзды сірке қышқылы, 28,5 мл дистильденген су) қосылды. Қоспа араластырылып, мұзда 10 минут инкубацияланды. Одан кейін қоспаға тең көлемде дистилденген хлороформ қосылып, мұқият араластырылды, 10 минут инкубациядан соң 4 ºС-та 13000 айн/мин жылдамдықпен 5 минут центрифугаланды. Жоғарғы (су) фазасы жаңа микропробиркаға ауыстырылып, оған көлемнің 6/10 бөлігіне тең алдын ала -20 ºС-та салқындатылған изопропанол қосылды. Қоспа жақсылап араластырылып, бөлме температурасында 15 минут инкубацияланды. Кейіннен қоспа 13000 айн/мин жылдамдықпен 10 минут центрифугаланды. Супернатант төгіліп, тұнба 70 % этанолмен жуылды. Соңында плазмидалық ДНҚ-ны қамтитын тұнба ауада кептіріліп, 50 мкл дистильденген суда ресуспензияланды.

2.2.3 Полимеразды тізбекті реакция

Аналитикалық процедуралар үшін Taq полимеразасы (Fermentas, №EP0402), ал препаративтік мақсаттар үшін Pwo полимеразасы (Roche, Cat. №11644955001) пайдаланылды. Реакциялық қоспаның жалпы көлемі 20 мкл құрады және оның құрамына: 1 мкл кері транскрипция өнімі, 2 мкл полимеразаға арналған буфер, 4 мкл 25 мМ $MgCl_2$, 0,5 мкл dNTP (10 мМ), 0,5 мкл ірі қара сарысулық альбумини (1 мг/мл), 0,3 мкл Taq немесе Pwo полимеразасы, 1 мкл тікелей және 1 мкл кері праймерлер (әрқайсысы 10 пмоль), сондай-ақ 8,7 мкл дистильденген су (dH_2O) енгізілді.

6-кесте - ПТР реакциясында қолданылған праймерлер жиынтығы

Праймер	Нуклеотидтік тізбек (5′– 3′)
Dir_NcoI_G-ecto	ACCGACCATGGGGAAATTTCCCATATATACG
Rev_XhoI_G-ecto	ATTTACTCGAGCTCGTTATCCGTACCACG
CALL001	GTCCTGGCTCTCTTCTACAAGG
CALL002	GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC
nest-PCR2 up	GTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCG ATGTGCAGCTGC AGGAGTCTGGGGGAGG
nest-PCR2 down	TTCGAAGGCCTCCCGGGCCTGAGGAGACGGTG ACCTGGGT
Dir_NcoI_VHH	GCCGCCCATGGGAATGAAATACCTATTGCC
Rev_BamHI_XVIII	CTAGAGGATCCCTCGTTATCCGTACCACGC
Dir_VHH_NcoI	GCCCAGCCGGCCATGGCCGATGTGC
Rev_VHH_XhoI	ATTACCTCGAGCTAAGACAGATCCTCTTC
Dir_VHH_BamHI	ATTACGGATCCATGGCCGATGTGCAGCTG
Rev_VHH_XbaI	ATCCGTCTAGATGAGGAGACGGTGACCTG
Dir_VHH_EcoRI	ACCGGGAATTCATGGCCGATGTGCAGCTG
Rev_VHH_XmaI	ATTTACCCGGGTGAGGAGACGGTGACCTG

ПТР-амплификация келесі температуралық режимде жүргізілді: бастапқы денатурация — 94 °C, 5 мин; амплификацияның 30 циклі: 94 °C – 1 мин, 45–55 °C – 30 с, 72 °C – 30 с; соңғы элонгация — 72 °C, 5 мин; сақтау кезеңі — 4 °C, 10 мин.

2.2.4 Қанның мононуклеарлы жасушаларынан жалпы РНҚ бөліп алу

Жалпы РНҚ-ны лимфоцит жасушаларынан Trizol реактивінің көмегімен бөлініп алынды. Жаңадан бөлініп алынған қанның мононуклеарлы жасушаларына 1 мл TRIzol реагентін қосылып, нуклеопротеидтер кешенінің толық диссоциациялануын қамтамасыз ету үшін 5 минут бойы инкубацияланды. Кейін лизис үшін қолданылатын TRIzol реагентінің 1 мл-іне 0,2 мл хлороформ қосылып, 2-3 минут инкубацияланып, 15 минут бойы 12000 x g жылдамдықта 4 ^{0}C температурада центрифугаланды. Қоспа төменгі ДНҚ мен белогы бар қызыл төменгі органикалық фазаға, интерфазаға және РНҚ-сы бар жоғарғы сулы фазаға бөлінді. РНҚ-сы бар жоғарғы сулы фазаны жаңа пробиркаға көшіріп, 1 мл TRIzol реагентіне 0,5 мл изопропанол қосылған соң 10 минут инкубацияланып, 10 минут бойы 12000 x g жылдамдықта 4 ^{0}C температурада центрифугаланды. Центрифугадан кейін супернатант төгіліп, пробирка түбіндегі тұнба 1 мл TRIzol

реагентіне 1 мл 75 % этанол есебінде ресуспензияланды. Кейін пробирка жақсылап вортекстеліп, 5 минут бойы 7500 x g жылдамдықта 4 ^{0}C температурада центрифугаланды. Тұнба кептіріліп, 20-50 мкл РНҚ-азадан таза су, 0,1 мМ ЕДТА, 0,5 % SDS ерітіндісімен РНҚ тұрақталды [126].

2.2.5 Кері транскрипция реакциясы

кДНҚ синтезі үшін стерильді пробиркаға төмендегідей компоненттер қосылды: РНҚ (10 нг – 5 мкг L. edodes тоталды РНҚ немесе 1–500 нг поли-А РНҚ), генге спецификалық праймер (15–20 пмоль) және стерильді dH_2O жалпы көлемі 12,5 мкл болатындай етіп. Кейін реакциялық қоспа екінші реттік құрылымдарды ажырату үшін 70 °C-та 5 минут қыздырылып, мұз үстінде салқындатылды. Одан соң қоспаға келесі реагенттер қосылды: 4 мкл 5× реакциялық буфер (250 мМ Tris-HCl, pH 8,3, 25 °C-та; 250 мМ KCl; 20 мМ $MgCl_2$; 50 мМ DTT), 0,5 мкл (20 бірлік) RiboLock™ RNase Inhibitor, 2 мкл 10 мМ dNTP қоспасы (соңғы концентрациясы – 1 мМ), 1 мкл (200 бірлік) RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase. Реакциялық қоспаның соңғы көлемі 20 мкл құрады. Қоспа мұқият араластырылып, 37 °C-та 5 минут инкубацияланды. Реакция 42 °C-та 1,5 сағат бойы су моншасында жүргізілді. Реакцияны 70 °C-та 10 минут қыздыру арқылы тоқтатылды. Алынған өнім –20 °C-та сақталды.

2.2.6 ДНҚ молекуласының рестрикциясы мен элюциясы

Молекулалық клондау мақсатында амплификацияланған ДНҚ мен вектордың рестрикциясын Termo Scientific™ (АҚШ) фирмасының рестрикциялық эндонуклеазалары мен сәйкес буферлері қолданылып жүргізілді. Рестрикция үшін жалпы көлемі 20 мкл болатын реакциялық қоспа пайдаланылды және оның құрамы төмендегідей болды: 2 мкл 10× реакциялық буфер, 0,3–1 мкг ДНҚ, 0,5 мкл 10 мг/мл БСА, әрбір рестриктазаның 2–10 бірлігі және соңғы көлемге дейін dH_2O. Рестрикция реакциясы 37°C температурада 20-60 минут бойы инкубациялау арқылы жүзеге асырылды. Рестрикция өнімдері 1 % агарозды гельде -электрофорез әдісімен талданды.

Агарозды гельде нуклеин қышқылдарын бөлгеннен кейін қажетті ДНҚ фрагменті гельдің негізгі массасынан мұқият кесіліп алынды және өндірушінің нұсқаулығына сәйкес “GenJet Gel Extraction Kit (#K0692, Termo Scientific™) жинағының көмегімен элюирленді.

2.2.7 ДНҚ фрагменті мен векторды лигирлеу

Амплификацияланған ДНҚ мен вектордың рестрикция өнімдерін лигирлеу үшін Termo Scientific™ (АҚШ) фирмасының бактериофаг T4 ДНҚ лигазасы (#EL004) қолданылды. Вектор мен енгізілетін фрагментті лигирлеу 3:1 молярлық қатынасында жүргізілді. Лигирлеу реакциясы үшін келесі компоненттер араластырылды: 1 мкл 10× лигаза буфері (50 мМ Tris-HCl, 10 мМ $MgCl_2$, 1 мМ АТФ, 10 мМ DTT, pH 7.5), векторлық ДНҚ және енгізілетін фрагмент, ал жалпы көлемі 9 мкл болатындай етіп dH_2O қосылды. Соңында 1 мкл T4 ДНҚ лигазасы

енгізілді. Реакциялық қоспа пипеткалау арқылы мұқият араластырылып, алдымен 16 °С-та 60 минут**,** кейін 4 °С-та түні бойы инкубацияланды.

Берілген молярлық қатынасында вектор мен енгізілетін фрагменттің санын есептеу үшін «Ligation calculator» (https://nebiocalculator.neb.com) онлайн калькуляторы қолданылды.

2.2.8 *Escherichia coli* компетентті жасушаларын дайындау

Компетентті жасушаларды алу үшін бактериялық жасушалар суспензиясы антибиотиктерсіз LB агарланған ортасына штрих әдісімен егілді. Түн ішінде өскен дара бактериялық колония LB агарлы табақшадан алынып, оны 10 мл LB сұйық ортасына (құрамы: 10 г бакто-триптон, 5 г ашытқы экстракты, 10 г NaCl, pH 7,0) инокуляцияланды және 37 °С температурада күшті аэрация жағдайында (дөңгелек шейкерде 200 айн/мин) түн бойы өсірілді. Түнгі культураның 1 мл көлемі 250 мл LB ортасына ресуспензияланып, 37 °С температурада және күшті аэрация жағдайында 2–4 сағат бойы жасушалардың оптикалық тығыздығы OD_{600} ≈ 0,4 (шамамен 10^8 жасуша/мл) деңгейіне жеткенге дейін.өсірілді. Осыдан кейін культура стерильді, алдын ала салқындатылған үлкен көлемді центрифугалық пробиркаларға құйылып, мұз үстінде 10 минут бойы салқындатылды. Клеткалар 4°С-та, 5000 айн/мин жылдамдықпен 5 минут центрифугаланып, тұнбаға түсті.

Хемикомпетентті жасушаларды дайындау үшін алынған жасушалық тұнба 50–80 мл суық ТВ буферінде (құрамы: 10 мМ Pipes-NaOH, pH 6.7; 15 мМ $CaCl_2$; 0.25 мМ KCl; 55 мМ $MnCl_2$) қайта суспензияланып, мұз үстінде 10 минут бойы инкубацияланды. Одан кейін жасушалық суспензия 4 °С-та 5000 айн/мин жылдамдықпен 10 минут центрифугаланды. Алынған тұнба 20 мл суық ТВ буферінде қайта суспензияланып, үстіне 1,5 мл DMSO қосылды және қоспа мұз үстінде 10 минут инкубацияланды. Дайындалған жасушалық суспензия аликвоталарға бөлініп, –80 °С температурада сақталды.

Escherichia coli электрокомпетентті жасушаларын алу үшін центрифугалау арқылы жиналған жасушалар үш рет 200 мл автоклавталған және алдын ала салқындатылған dH_2O-мен, сондай-ақ үш рет салқындатылған стерильді 10% глицерин ерітіндісімен жуылды. Одан кейін жасушалар қайтадан центрифугаланып, супернатант абайлап төгілді. Алынған жасушалық тұнба 3 мл 10% глицерин ерітіндісінде ресуспензияланды. Дайын суспензия 200 мкл көлемінде алдын ала салқындатылған пробиркаларға бөлініп, алынған электрокомпетентті жасушалар –80 °С температурада сақталды.

2.2.9 *Escherichia coli* бактерияларының трансформациясы

Салқындатылған стерильді пипетканың көмегімен 200 мкл компетентті жасушалар суспензиясы стерильді микропробиркаға ауыстырылды. Оның үстіне лигаза қоспасындағы ДНҚ (50 нг-нан аспайтын мөлшерде, жалпы көлемі 10 мкл-ден аспайтын) қосылып, қоспа абайлап араластырылды және мұз үстінде 30 минут инкубацияланды. Инкубациядан кейін жасушалар 42 ºС температурада 90 секунд бойы су моншасында жылулық шокқа ұшыратылып, содан соң мұз үстінде 5 минут инкубацияланды. Кейін үстіне 800 мкл SOC ортасы (құрамы: 20

г бакто-триптон, 5 г ашытқы экстракты, 0,5 г NaCl, pH 7,0, 20 мМ глюкоза) қосылып, 37 °С-та, 100 айн/мин жылдамдықпен шайқалатын құрылғыда 45 минут бойы орташа аэрация жағдайында өсірілді. Одан соң 200 мкл трансформаланған компетентті жасушалар құрамында 100 мкг/мл ампициллин бар қатты агарланған LB ортасына себілді. Жасушалар агар бетіне стерильді иілген әйнек таяқшамен біркелкі таралды. Чашкалар 37 °С температурада түні бойы инкубацияланды.

Электрокомпетентті жасушаларды лигазалық қоспамен трансформациялау «Bio-Rad GenePulse™» электропораторының көмегімен электропорация әдісі арқылы жүргізілді. Ол үшін алдын ала салқындатылған, электропорацияға арналған 2 мм саңылауы бар арнайы кюветаларға 50 мкл электрокомпетентті жасушалар енгізілді. Кейін жасушаларға 1 мкл лигазалық қоспа қосылып, ұқыпты түрде пипеткамен араластырылды. Электропорация келесі параметрлерде орындалды: кернеу — 2,5 kV, сыйымдылық — 25 μF, электрлік кедергі — 200 Ом. Импульс берілгеннен кейін жасушаларға 1 мл SOC қоректік ортасы қосылып, қалыпты аэрация жағдайында (100 айн/мин) 37 °С температурада шайқағыш инкубаторда 45 минут бойы өсірілді. Жасушалық суспензияның лайлануы байқалған соң, трансформацияланған жасушалардың 200 мкл көлемі ампициллин (100 мкг/мл) қосылған LB агар ортасының бетіне біркелкі жағылды. Петри табақшалары бөлме температурасында кептіріліп, кейін төңкеріліп қойылып, 37 °С температурада бір түн бойы инкубацияланды.

2.2.10 *Escherichia coli* бактериалды клеткаларындағы ақуыз экспрессиясы

Рекомбинантты ақуыздардың экспрессиясын T7 промоторының бақылауында индукциялау үшін селективті ортада өскен трансформацияланған *E. coli* колонияларының бірнешеуі канамициннің 70 мкг/мл концентрациясы бар 20 мл LB ортасына егілді және 37 °С температурада, 180 айн/мин жылдамдықпен шайқағыш инкубаторда бір түн бойы өсірілді. Келесі күні алынған түнгі культура 1 л көлеміндегі ампициллиннің 100 мкг/мл концентрациясы бар сұйық LB ортасына ресуспензияланды. Бактериялық культураның өсуі 30 °С температурада оптикалық тығыздық $OD_{600}\approx0,6$ мәніне жеткенге дейін жүргізілді. Қажетті тығыздыққа жеткеннен кейін культураға гендердің белсенді экспрессиясын индукциялайтын изопропилтиогалактозид (ИПТГ) соңғы концентрациясы 0,2 мМ мөлшерінде енгізілді. Индукциядан кейінгі өсіру процесі 30 °С температурада және 180 айн/мин жылдамдықпен аэрация жағдайында 12 сағат бойы жалғастырылды. Бактериялық биомассаны жинау 6000 айн/мин жылдамдықта, 4 °С температурада 7 минут бойы центрифугалау арқылы жүзеге асырылды. Тұндырылған жасушалар көлеміне байланысты 10–15 мл сақтау буферінде (20 мМ HEPES, pH 7,6 және 40 мМ NaCl) ресуспензияланып, –20 °С температурада сақталды.

2.2.11 Ақуыздарды бөліп алу және металл-аффинді хроматографиялық әдіспен тазалау

2.2.11.1 Ақуыздардың еритін фракциясын тазалау

Барлық тазалау процедуралары 4 °C температурада жүргізілді. Рекомбинантты ақуыздарды нативті (денатурацияланбаған) күйінде тазалау үшін жасушалар центрифугалау арқылы жиналып, алынған жасушалық тұнбалар ультрадыбыстық өңдеу әдісімен лизиске ұшыратылды. Лизис 50 мМ натрий фосфатты буферінде (pH 7,6), 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА (pH 8,0), 5 % глицерин, 20 мМ имидазол, 1 мМ ДТТ, 10 мМ β-меркаптоэтанол және 2 % Triton X-100 құрамындағы ерітіндіде, толық протеаза тежегіштер коктейлімен (Roche Diagnostics, Швейцария) толықтырылған жағдайда жүргізілді. ЭДТА протеазалардың белсенділігін тежеу үшін қолданылды, ал β-меркаптоэтанол мен ДТТ тотықсыздандырғыш ортаны сақтау мақсатында енгізілді. Жұмсақ иондық емес детергент Triton X-100 мембраналық ақуыздарды тиімді ерітіп, цитоплазмалық ақуыздарды бөліп алуға мүмкіндік береді және бұл ретте ақуыздардың нативті конформациясы сақталады.

Жасушалық лизаттар 4 °C температурада 11000 × g жылдамдықта 60 минут бойы центрифугалау арқылы тазартылды. Алынған супернатант Ni^{2+} иондарымен зарядталған 1 мл көлеміндегі HisTrap HP (GE Healthcare) колонкасы бойымен жүргізілді. Байланған ақуыздар 20–500 мМ аралығындағы имидазол градиентін пайдалану арқылы элюирленді. Тазартылған ақуыз үлгілері 50 % глицерин ерітіндісінде −20 °C температурада сақталды. Ақуыз препараттарының біртектілігі ДСН-ПААГ әдісі арқылы расталды. rRABV-G-XVIII ақуызының тримерлі формаларын талдау үшін Tris-Bis жүйесі, NuPAGE™ Bis-Tris (4–12 %, Invitrogen™, АҚШ) мини-гельдері және 10 × тотықсыздандырғыш агенті бар NuPAGE™ LDS (4X) үлгі буфері қолданылды.

2.2.11.2 Ақуыздардың ерімейтін фракциясын тазалау және рефолдинг

1л көлеміндегі жиналған жасушалардан инклюзиялық денешіктерін (inclusion bodies) бөліп алу және тазарту үшін жасушалар 20 мл көлемдегі құрамында 20 мМ NaCl бар 50 мМ натрий-фосфат буферінде (pH 7,6) ресуспензияланды және ультрадыбыстық гомогенизация әдісімен (жиілігі 150 kHz, UltraSonic 300VT соникаторы) лизиске ұшыратылды. Алынған жасушалық лизат 4°C температурада 14 000 айн/мин жылдамдықпен 20 минут центрифугаланды. Тұнба 1 % Triton X-100 бар 1 М мочевина ерітіндісінде 20 мл көлемінде ресуспензияланып, қайта центрифугаланды. Одан кейін тұнба сол буфермен үш рет қайта суспензияланып, жуылып тазартылды.

Қосындылар денешіктерін денатурациялау және тотықсыздандыру үшін тазартылған денешіктер құрамында 8 М мочевина, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 500 мМ NaCl және 20 мМ имидазол бар 100 мл 50 мМ натрий-фосфат (pH 7,6) буферінде ерітіліп, 16 сағат бойы бөлме температурасында тұрақты араластыру жағдайында инкубацияланды. Бұл процесс толық денатурация мен тотықсыздандыруды қамтамасыз етті. Ерімеген материал 4 °C температурада 12 000 айн/мин жылдамдықпен 20 минут центрифугаланды. Алынған супернатант Ni^{2+} иондарымен зарядталған 1 мл көлеміндегі HisTrap HP колонкасына (GE Healthcare) енгізілді. Байланған ақуыздар 20–500 мМ диапазонында имидазол градиенті арқылы элюцияланды.

Денатурацияланған rRABV-GE ақуызының рефолдингі 14 кДа өткізгіштік қабілеті бар Cellu Sep целлюлозалық мембранасы арқылы 4 °C температурада градиентті диализ әдісімен жүргізілді. Диализ буфері құрамында 100 мМ NaCl, 50 мМ натрий-фосфат буфері (pH 7,6), 0,5 М аргинин, 20 % глицерин және 6–0 М мочевина болды және әрбір 3 сағат сайын жаңартылып отырды.

2.2.12 ПААГ электрофорез

Ақуыздарды молекулалық массалары бойынша бөлу денатурациялаушы жағдайда Лэммли әдісімен полиакриламидті гельдегі электрофорез арқылы жүзеге асырылды. Ақуыз үлгілері 2x үлгі буферінде (2x: 125 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 10 % β-меркаптоэтанол, 4 % SDS, 0.02 % бромфенол көгі, 20 % глицерин) дайындалып, 100 °C температурада 5 минут қайнатылды. Одан кейін 20 мкг жалпы ақуыз үлгісі 5 % концентрлеуші гельге енгізіліп, 80 V кернеуде ақуыздарды шоғырландыру жүргізілді. Ақуыздарды бөлу 10–12 % бөлуші гельде 180 V кернеуде орындалды. Электродтық буфер ретінде стандартты Трис-глицин буфері (pH 8.3; 25 мМ Tris, 192 мМ глицин, 0.1 % SDS) қолданылды. Электрофорез аяқталғаннан кейін гельді бөлме температурасында Кумасси ерітіндісінде (50 % метанол, 10 % сірке қышқылы, 0.25 % Coomassie Blue R-250) 1 сағат бойы боялды. Кейін бояу ерітіндісі төгілді де, оның орнына жуу ерітіндісі (10 % метанол, 5 % сірке қышқылы) қосылды. Гель ақуызсыз аймақтар мөлдір болғанға дейін ерітіндіні жеңіл шайқап, араластыру арқылы жуылды.

2.2.13. Вестерн блоттинг

Әрбір тазартылған ақуыздың 2 мкг мөлшері 10 % ДСН-ПААГ (SDS-PAGE) гелінде бөлінді. Бұдан кейін гель өндіруші нұсқаулығына сәйкес Bio-Rad Mini-transblot Cell жүйесін пайдалана отырып, PVDF мембранасына электроблоттау арқылы көшірілді. Көшірілгеннен кейін мембрана 1× TBS буферінде (50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 20 мМ NaCl) дайындалған блоктау ерітіндісінде (5% майсыздандырылған сүт және 0,1% Tween 20) бөлме температурасында 1,5 сағат бойы жұмсақ араластыру жағдайында инкубацияланды. Блоктау ерітіндісі алынғаннан кейін мембрана 10 мл көлеміндегі анти-Мус моноклоналды антидене ерітіндісінде (Abcam, 1:5000 сұйылту, құрамында 0,1% Tween 20 бар блоктау ерітіндісінде дайындалған) 4°C температурада түні бойы инкубацияланды. Одан кейін мембрана 1×TBS буферінде (0,1% Tween 20 қосылған) 10 мл көлемінде бес рет, әр жолы 5 минуттан жуылды. Содан соң мембрана 10 мл анти-тышқан IgG екіншілік антидене ерітіндісінде (1:10000 сұйылту, құрамында 0,1% Tween 20 бар блоктау ерітіндісінде) бөлме температурасында 1 сағат бойы инкубацияланды. Кейіннен мембрана қайтадан 1× TBS буферінде (0,1% Tween 20) 10 мл көлемінде бес рет, әр жолы 5 минуттан жуылып тазартылды. Субстраттың жұмысшы ерітіндісі тең көлемдегі H_2O_2 ерітіндісі мен люминол/күшейткіш ерітіндісін араластыру арқылы дайындалды және ол блоттың 1 см² бетіне 0,1 мл есебімен қолданылды. Мембрана жұмысшы ерітіндіде қараңғы жерде 60-120 секунд инкубацияланды, содан кейін Kodak X-Omat пленкасы арқылы экспозиция жүргізілді.

2.2.14 Гель-фильтрация

Гель-фильтрация Superose 6 Increase 10/300 GL (Cytiva, АҚШ) колонкаларында жүргізді. Колонка 0,5 М аргинин, 50 мМ натрий фосфатты буфері және 100 мМ NaCl қоспасынан тұратын ерітіндінің бес колонкалық көлемімен теңгерілді және pH 7,0 мәніне келтірілді. Тазартылған белоктар гель-фильтрациялық хромотография алдында ерімейтін ақуыз агрегаттарынан арылу үшін 0,22 мкм сүзгі арқылы сүзілді. Колонкаға концентрациясы 2,0 мг/мл болатын 500 мкл белок үлгілері жүктелді. Үлгілер 0,4 мл/мин ағын жылдамдығында теңгерілген буфермен хроматографиядан өткізілді. Элюцияланған белоктар 280 нм ультрафиолет сәулесімен анықталып, SDS-PAGE әдісімен расталды. G ақуыздарының молекулалық массасын салыстыру үшін гель-фильтрациялық колонка молекулалық массасы белгілі стандартты маркерлерді қолдана отырып калибрленді.

2.2.15 anti-CVS-11 поликлоналды антиденесін дайындау

RABV вакцинасына қарсы антидене алу үшін бастапқы иммундау кезінде қояннның арқасының бес нүктесіне 1 мл көлеміндегі RHABDOVAC 1 вакцинасы тері астына енгізілді. Қайта иммунизациялау үш рет, әрбір 14 күндік аралықпен 1 мл вакцина ерітіндісін пайдалана отырып жүргізілді. Соңғы инъекциядан бір апта өткен соң қан алынды және алынған 3 мл қоян антисарысуына 50 % қанығуға дейін аммоний сульфаты қосылды. Тұнба центрифугалау арқылы жиналып, кейін тазартылған суда ерітілді және 10 мМ калий-фосфат буферіне (pH 7,0) қарсы диализден өткізілді. Алынған иммуноглобулиндер фракциясы осы буфермен теңгерілген протеин А бар агароза түйіршіктерінен тұратын колонкаға жүктелді. Колонка сол буфермен жуылғаннан кейін антиденелер 100 мМ глицин буфері (pH 3,0) арқылы элюцияланды. IgG бар фракциялар біріктіріліп, олардың pH мәні 1,0 М Трис-негізі арқылы 7,0-ге дейін түзетілді. Алынған суспензия 4 °C температурада сақталды.

2.2.16 Антисарысу титрін ИФТ әдісімен анықтау

Антисарысу титрлері жанама ИФТ (иммуноферменттік талдау) әдісі арқылы анықталды. ИФТ әдісіне арналған MaxiSorp® 96 ұяшықты планшеттің (Thermo Fisher Scientific, Уолтхэм, Массачусетс, АҚШ) ұяшықтарына 1× PBS буферінде (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na2HPO4, 1,8 мМ KH2PO4, pH 7,4) ерітілген 1 мкг/мл концентрациясындағы 100 мкл көлемдегі рекомбинантты rRABV-GE, rRABV-G-XVIII құтыру вирусының белогы немесе белсенді емес CVS-11 құтыру вирусының штаммы енгізіліп, планшетті 600 айн/мин жылдамдықпен араластыра отырып, 4 °C температурада түнде байланыстыру үшін қалдырылды. Инкубациядан кейін ұяшықтар 1× PBST буферімен (0,05% Tween 20 PBS ерітіндісінде, pH 7,4) үш рет жуылды. Бұдан соң әр ұяшыққа 1× PBST ерітіндісінде дайындалған 3 % BSA ерітіндісінен 100 мкл қосылып, 37 °C температурада 1 сағат бойы инкубацияланды. Үш рет жуылғаннан кейін барлық тышқан топтарынан алынған сарысу үлгілерінің сериялық сұйылтылған ерітінділерінің әрқайсысынан 100 мкл мөлшерде 1 % (масс./көлем.) BSA-ның

PBST-дегі ерітіндісінде 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16 000, 1:32 000, 1:64 000, 1:128 000 және 1:256 000 қатынастарында планшетке енгізіліп, бөлме температурасында 1 сағат инкубацияланды. Планшеттер қайтадан жуу буферімен бес рет жуылды. Содан кейін ұяшыққа желкек пероксидазасымен конъюгацияланған тышқан IgG-ге қарсы ешкі антиденелері (1:5000, 1× PBST ерітіндісінде) енгізіліп, 37 °C температурада 1 сағат инкубацияланды. Одан кейін планшеттер жуу буферімен бес рет жуылды. Әрбір планшет ұяшығына TMB субстраты қосылып, түстің дамуына мүмкіндік берілді. Түс түзілу реакциясы 1 М күкірт қышқылының көмегімен тоқтатылды. Абсорбция 450 нм толқын ұзындығында микропланшеттік ридерде (DAS, Паломбара-Сабина, Рим, Италия) өлшенді. Соңғы титр $OD_{450} \geq 0,1$ мәнін көрсеткен сарысудың ең жоғары сұйылту дәрежесі ретінде анықталды [126].

2.2.17 Антисарысулардың нейтрализация реакциясы әдісі

Vero жасушалары ($1,5 \times 10^4$) 96 ұяшықты планшетке (Corning Incorporated, Corning, NY, АҚШ) себілді және құрамында 5% FBS бар DMEM F-12 (Gibco, Grand Island, NY, АҚШ) ортасында өсірілді. Инкубация 37 °C температурада, 5% CO_2 бар ылғалды атмосферада 24 сағат бойы жүргізілді. rRABV-GE вакцинасымен және адъювантпен немесе онсыз енгізілген rRABV-G-XVIII ақуызымен иммундаудан кейін алынған тышқан сарысулары зерттелді. Барлық біріктірілген сарысулар 56 °C температурада 30 минут бойы қыздыру арқылы инактивтелді, содан кейін құрамында 10% FBS бар толық DMEM ортасында екі есе реттік сұйылту арқылы дайындалды (Capricorn Scientific, Эбсдорфергрунд, Германия). Сарысулар шамамен 100 $ТЦД_{50}$ мөлшерінде CVS-11 штаммды құтыру вирусының сұйылтылған үлгілерімен тең көлемде араластырылып, 37 °C температурада 2 сағат инкубацияланды. Кейіннен сарысу мен вирус қоспалары тиісті ұяшықтарға (1:2-ден 1:512-ге дейінгі сұйылтулар) енгізілді. Сынаққа оң бақылау ретінде инактивтелген құтыруға қарсы вакцинаны енгізген тышқандардың сарысулары пайдаланылды. Планшет 37 °C температурада және 5% CO_2 бар жағдайда 6 күн бойы инкубацияланды. Осыдан кейін Vero жасушалары инверттелген жарық микроскопының көмегімен цитопатикалық әсердің (ЦПӘ) бар-жоғына зерттелді. Нейтрализдеуші титрлер ЦПӘ толық (100%) тежелген ең жоғары сұйылту дәрежесі ретінде анықталды [126].

2.2.18 Дромедарлардың иммунизациясы

Бұл эксперимент үшін жасы 3 жастағы сау дромедар (*Camelus dromedarius*) таңдап алынды. Жануар Алматы қаласындағы «Антиген» ғылыми-өндірістік кәсіпорнында (ЖШС) орналастырылды. Дромедар ашық ауада орналасқан, көлеңкеленген аймақтары бар қоршауда ұсталды және күн сайын сапалы шөп, 2 кг құрама жем (бидай кебегі, жоңышқа түйіршіктері және аралас дән түйіршіктері) мен ауыз суға еркін қол жеткізумен қамтамасыз етілді. Жануарға алғашқы егуде rRABV-G-XVIII ақуызының (500 мкг) және Фрейндтің толық адъювантының (1:1 қатынасындағы) қоспасы апталық аралықпен бес рет тері астына енгізілді. Кейінгі иммунизация кезінде лимфоидты В-жасушалардың

антигенге тән наноденелерді экспрессиялауын ынталандыру мақсатында ақуыз бен Фрейндтің толық емес адъювантының қоспасы пайдаланылды. Иммундау басталғаннан отыз бес күн өткен соң 100 мл антикоагулянт қосылған қан алынып, одан плазма мен шеткері қан лимфоциттері бөлініп алынды [126].

2.2.19 Түйелердің шеткі (перифериялық) қанынан лимфоциттерді бөліп алу

Стерильді жағдайда, этикалық нормаларды сақтап түйенің мойын көктамырынан алынған қан 1:1 қатынасында 1x PBS ерітіндісінде сұйылтылды. 3 мл Ficoll-Paque PLUS ерітіндісі центрифугалық пробиркаға құйылып, үстіне 4 мл сұйылтылған қан пробирка шетін бойлай ақырын құйылды. Қан Ficoll-Paque PLUS ерітіндісімен араласпай, бетін жауып тұрады. 18-20 ^{0}C температурада 400 x g жылдамдығымен 30 минут центрифугаланды. Тығыздық градиенті бойынша центрифугалау нәтижесінде пробиркада төмендегідей қабаттар пайда болады: қан жасушалары, Ficoll-Paque PLUS ерітіндісі, лимфоциттер, қан плазмасы. Пастер пипеткасы көмегімен лимфоциттер қабаты сорып алынып, бір пробиркаға жиналып, PBS ерітіндісімен 3 рет шайылды. Тазаланған лимфоцит жасушаларынан бірден РНҚ бөлінді [126].

2.2.20 VHH (наноантидене) өз кітапханасын жасау

Жалпы РНҚ шамамен 10^{7}/мл лимфоциттерден TRIzol™ реагенттер жиынтығының (Thermo Fisher Scientific, АҚШ) көмегімен экстракцияланды. Алынған жалпы РНҚ (5 мкг) негізінде бірінші тізбекті кДНҚ синтезі жүргізілді, ол үшін First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, АҚШ) жиынтығы және oligo(dT)$_{18}$ праймері пайдаланылды. VH гендерінің ластануын болдырмау мақсатында иммуноглобулиндердің ауыр тізбегінің вариабельді домендері (VHH) екі сатылы салынған (nested) ПТР әдісімен амплификацияланды. Бірінші кезеңде ПТР реакциясы алғашқы кДНҚ тізбегін матрица ретінде қолданып, CALL001 және CALL002 праймерлерінің көмегімен орындалды; бұл праймерлер тиісінше көшбасшы (leader) реттілігі мен дромедар иммуноглобулиндерінің ауыр тізбегіндегі CH2 экзонына бағытталған [113]. ПТР бағдарламасы төмендегідей жүргізілді: бастапқы денатурация: 94 °C – 7 минут; -30 цикл: 94 °C – 1 минут, 55 °C – 1 минут, 72 °C – 1 минут; соңғы ұзару (elongation): 72 °C – 10 минут.

Нәтижесінде шамамен 600 жұп нуклеотидтен тұратын (VHH–CH2, бірақ CH1 экзоны жоқ) ПТР өнімдері алынды. Бұл өнімдер агарозды гельден элюцияланып, 900 жұп нуклеотидтік (VH–CH1–CH2) фрагменттен бөлініп, екінші ПТР реакциясына матрица ретінде пайдаланылды. Келесі қадамда VHH кодтайтын гендік фрагменттер екінші (nested) ПТР арқылы *SfiI* рестрикциялық сайттарын қамтитын nest-PCR2 up және nest-PCR2 праймерлерімен амплификацияланды. Алынған амплификаттар *SfiI* және *BglI* рестриктазаларымен кесілгеннен кейін, pADL23c фагмидіне (№PD0111, Antibody Design Labs, АҚШ) лигирленді және *E. coli* TG1 компетентті жасушаларына электротрансформация әдісімен енгізілді [105]. Трансформанттар 2% глюкоза және 100 мкг/мл ампициллин бар 2×YT қоректік

ортасына егіліп, 37°C температурада бір түн бойы өсірілді. Градиенттік сұйылту әдісі арқылы кітапхананың көлемі (комбинаторлық күрделілігі) колония саны бойынша бағаланды. Сонымен қатар, кітапханаға кірістірілген фрагменттердің жиілігін анықтау мақсатында сегіз колония таңдалып, ПТР талдауы жүргізілді [126].

2.2.21 RABV-G-XVIII ақуызына спецификалық оң клондарды бөліп алу (биопэннинг)

Мұздатылған кітапханадан шамамен 1×10^{10} TG1 жасушалары алынып, құрамында 100 мкг/мл ампициллин және 2 % (w/v) глюкоза бар 2×ТҮ қоректік ортасында өсірілді. Глюкоза бактериалды культураның өсуі кезінде антиденелердің экспрессиясын басу үшін қолданылды. Өсіру процесі оптикалық тығыздық (OD_{600}) шамасы 0,1-ден 0,4–0,5 мәніне жеткенге дейін жүргізілді. Екі сағаттан кейін жасушалар 1×10^{12} M13KO7 көмекші фагымен (Thermo Fisher Scientific, АҚШ) 37 °C температурада 30–60 минут инфекцияланды. Инфекцияланған жасушалар 4 °C температурада, 3200 x g жылдамдықпен 10 минут центрифугаланды, содан кейін олар 100 мкг/мл ампициллин және 70 мкг/мл канамицин бар 2×ТҮ ортасында қайта суспензияланды. Культура 37 °C температурада, 220 айн/мин жылдамдықпен шайқалатын инкубаторда бір түн бойы өсірілді. Культуралық сұйықтықтан фагтар полиэтиленгликоль (ПЭГ) ерітіндісінде (20 % ПЭГ 6000, 2,5 M NaCl**)** мұз үстінде 1 сағат инкубациялау арқылы тұндырылды, содан кейін 4°C температурада, 3200 x g, 30 минут центрифугаланды. Алынған тұнба 1 мл 1×PBS ерітіндісінде ерітілді. Фаг титрін анықтау үшін супернатанттың 50 есе сұйылтылған үлгісінің 260 нм толқын ұзындығындағы жұтылу көрсеткіші (A_{260}) өлшенді. A_{260} = 1,0 шамамен 3×10^{10} инфекциялық фаг бөлшектеріне/мл сәйкес келеді. Әрбір биопэннинг раунды үшін шамамен 2×10^{11} фаг бөлшектері пайдаланылды. Фаг ерітіндісі 2 % (w/v) майсыздандырылған құрғақ сүт бар 1×PBS (MPBS) ерітіндісінде сұйылтылып, антиген ретінде 100 мкг/мл концентрациядағы инактивтелген RABV-пен қапталған Nunc Maxisorp планшеттерінде (100 мкл/ұяшық) 60 минут бойы бөлме температурасында инкубацияланды. Инкубациядан кейін планшеттер 1×PBS ерітіндісімен 10 рет жуылды, ал байланысқан фагтар 1 мг/мл трипсиннің жаңа дайындалған 120 мкл ерітіндісімен элюцияланып, 10 минут бойы бөлме температурасында араластыра инкубацияланды. Элюцияланған фагтар OD_{600} = 0,5 мәні бар жаңа TG1 культураларын инфекциялау үшін қолданылды. Үш дәйекті биопаннинг раундын өткізгеннен кейін 80 колония таңдап алынды. Әрбір клоннан бір доменді антидене (sdAb) генін қамтитын периплазмалық экстракттар стандартты протоколдарға сәйкес дайындалды. Таңдап алынған клондар әрі қарай секвенирлеуге жіберілді.

2.2.22 ИФА әдісі арқылы спецификалық VHH клондарына скрининг жасау

Позитивті колонияларды алу мақсатында 80 жеке колония кездейсоқ таңдалып, периплазмалық экстрактты (PE-ELISA) қолдану арқылы ИФТ талдауы жүргізілді. Әрбір колония 100 мкг/мл ампициллин бар 1 мл Terrific Broth (ТВ)

ортасында өсірілді және 3 сағат бойы 37 °C температурада инкубацияланды. Осыдан кейін экспрессияны индукциялау үшін ортаға изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) қосылды және культура 28°C температурада бір түн бойы өсірілді. Клеткалардың супернатанты осмостық шоктан кейін жиналып, алдын ала 10 мкг RABV-G ақуызымен қапталған (16 сағат, 4 °C) Nunc MaxiSorp микропланшеттерінің ұяшықтарына енгізілді. Планшеттер 1×PBST ерітіндісімен үш рет жуылып, кейін блоктау буферінде 37°C температурада 1 сағат инкубацияланды. Бұдан соң ұяшықтар тышқаннан алынған HRP-конъюгирленген анти-Мус тегке қарсы моноклоналды антиденемен (1:2000; ab1326, Abcam, АҚШ) өңделіп, тағы 1 сағат инкубацияланды. Реакция өнімін анықтау үшін ұяшықтарға пероксидаза субстраты – 3,3′,5,5′-тетраметилбензидин (TMB; Bio-Rad, Hercules, CA, АҚШ) қосылды. Реакция 1 М H_2SO_4 ерітіндісімен тоқтатылып, 450 нм толқын ұзындығында планшет ридері (DAS, Италия) көмегімен өлшенді. Нәтижесінде ең жоғары оң мән көрсеткен колония секвенирленді [126].

2.2.23 ПТР өнімдерін секвенирлеу

Гельден ДНҚ амплификацияланған кесінділерін тазалау GenElute™ Gel Extraction (Sigma-ALDRICH, АҚШ) жиынтығымен жүргізілді. Кесіп алынған өнім мөлшерін пробиркаға салып, өлшенді. Гельдің таза салмағынан алты көлем “Gel Sol” қосылып, “Thermomixer comfort” орналастырып, 55°C 10 мин қыздырылды және 10000 айн/мин 15 секунд айналдырылды.

Колонкаларды пробиркаға салынып, 500 мкл Column Prep құйылып, 13000 айн/мин 1 мин центрифугаланды. Гельдің таза салмағына екі көлем изопропанол қосып, гомогенизацияға дейін араластырылды. Колонкаға ауыстырып, 13000 айн/мин 1 мин центрифугаланды. Бос колонкаларға 700 мкл “Wash solution” қосылып, 13000 айн/мин 1 мин центрифугаланды. Ақырғы сатыда 50 мкл “Elution” ерітіндісін қосылып, 1 мин инкубацияланған соң 13000 айн/мин 1 мин центрифугаланды.

ДНҚ секвенирлеу үшін Сенгер бойынша дидеоксисеквенирлеу әдісі қолданылды. ДНҚ тізбегін таңбалау үшін BigDye Ready Reaction kit v1.1., v3.1. жиынтығын, сонымен қатар тазаланған ПТР өнімдері (кДНҚ кесінділері) мен оған арналған секвенирлеуші праймерлер қолданылды. Қоспаға вирустың кДНҚ (ПТР өнім) - 4 мкл, праймер (тура немесе кері) - 3,2 pmol, ReadyReaction kit v.1.1. немесе 3.1. жиынтығы - 5 мкл, су - 10 мкл дейін қосылды. Секвенирлеуші ПТР амплификациясы келесі температура-уақыттық тәртіпке сай жүргізілді: бастапқы денатурация 96°C – 1 мин, амплификация 25 цикл; 96 ºC – 10 сек, 50 °C – 5 сек, 60 °C – 4 мин. Байланыспаған бояудан ДНҚ тазалау CleanSeq Reagent көмегімен қоса тіркелген хаттама бойынша жүргізілді. ДНҚ секвенирлеу хаттамаға сай ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems, АҚШ) 8-түтікті секвенаторда жүргізілді.

2.2.24 Құтыру вирусына қарсы наноантиденелердің бейтараптандыру әсерін тышқандарда талдау

Барлық эксперименттер 6–8 апталық швейцариялық аутбредті ұрғашы тышқандар (Charles River, Франция) қолданылды. Эксперименттер «Антиген» ғылыми-өндірістік кәсіпорны ЖШС-нің жергілікті этикалық комитетімен 2022 жылғы 28 наурыздағы №124 бұйрыққа сәйкес мақұлданған. Тышқандар фильтрлі қақпағы бар торларда ұсталды, оларға су мен жем еркін берілді**,** және табиғи жарық режимі (күн/түн) сақталды. VHH-I, VHH-II және VHH-III наноантденелері (0,3 мг/мл) жеке-жеке RABV вирусының (CVS-11 штамы, ATCC VR959 референті) 2500 LD_{50}/5 мл дозасымен араластырылып, мұз үстінде 1 сағат инкубацияланды**.** Содан кейін антидене мен вирустың қоспасы тышқанның артқы аяғына енгізілді. Оң бақылау тобына «Антиген» ҒӨК ЖШС шығарған ERIG (15,4 МЕ/мл) препаратын сол әдіспен енгізу қолданылды. Бақылау топтары екі нұсқадан тұрды:

1. тек PBS ерітіндісі енгізілген топ;
2. PBS-тегі 2500 LD_{50} дозасындағы вирус енгізілген топ.

Тышқандар инфекцияланғаннан кейін күн сайын бақыланып, сырттай тексеріліп және салмақтары өлшеніп отырды**.** Наноденелердің бейтараптандыру әсері тышқандардың тірі қалу көрсеткіші бойынша бағаланды.

2.2.25 Статистикалық талдау

Барлық эксперименттер үш қайталауда жүргізілді, ал нәтижелер орташа мән ± стандартты ауытқу (SD) түрінде өрнектелді. Алынған деректер Anova статистикалық әдісі арқылы бағаланды. Статистикалық талдау Prism бағдарламалық қамтылымы (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, АҚШ) көмегімен жүргізілді. $P < 0,05$ мәндері статистикалық тұрғыдан айтарлықтай айырмашылық бар деп есептелді [126].

3 НӘТИЖЕЛЕР МЕН ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ

3.1 Құтыру вирусының G-ақуызының рекомбинантты дұрыс конформацияланаған түріндегі экспрессиясы және экспрессия өнімі антигенділігінің бағалануы.

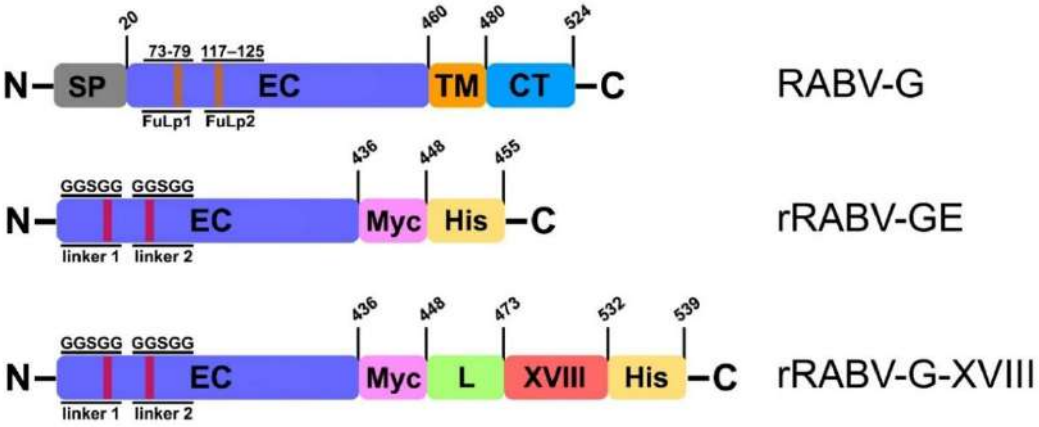
3.1.1 rRABV-GE және rRABV-G-XVIII гендерінің экспрессиясына арналған рекомбинантты ДНҚ-конструкциясын алу

Құтыру вирусының G гликопротеині (RABV-G) — I типті мембраналық гликопротеин болып табылады, ол тример (3 × 65 кДа) түрінде кездеседі және вирус мембранасынан сыртқа шамамен 8,3 нм-ге созылып орналасады. Құтыру вирусының G гликопротеинінің сыртқы, шығыңқы бөлігі (эктодомен) қожайын жасушаның бетінде орналасқан рецепторларды тануда маңызды рөл атқарады. Бұл процесс вирустың патогенезі үшін маңызды болып табылады және вирусты бейтараптандырушы антиденелердің негізгі әсер етуші нысанасы болып саналады [127]. Бактерия мен ашытқыларда экспрессияланған құтыру вирусының G ақуызының эктодоменінің (RABV-GE) антиген ретінде жануар моделдерінде қорғаныштық иммунитетті шақыру эффектісі өте төмен [128]. Алайда, эукариоттық жасушаларда экспрессияланып, таза күйде бөлініп алынған RABV-GE жануарлар үлгілерінде вакцина ретінде тиімділігі көрсетілген [129]. Эукариоттық жасушаларда экспрессияланған ерігіштік деңгейі жоғары RABV-GE мономерлік конформацияда түзіледі және антигендік қасиеті тұрғысынан алып қарағанда мембранаға бекітілген толыққанды табиғи тримерлік гликопротеиннен едәуір ерекшеленеді [130]. Осы нәтижелер ақуыздың табиғи конформациясын сақтау оның антигендік қасиеттері мен иммуногенділігін қамтамасыз етуде маңызды роль ойнайтындығын көрсетеді.

Осы зерттеуде құтыру ауруына қарсы рекомбинантты вакцина үміткерлерін алу үшін жаңа тәсіл қолданылды. Жоғарыда айтылғандай, RABV-GE құтыруға қарсы вакциналардың иммунологиялық тұрғыдан ең маңызды компоненті болғандықтан, RABV-GE ақуызын вирус гликопротенінің табиғи конформациясына ұқсас тримерлік түрде көрсету үшін, оны адам коллагенінің XVIII типті тримеризациялық доменімен [131-133] біріктіретін конструкциясы (rRABV-G-XVIII) жасалынды. Адам коллагенінің XVIII типті тримеризациялық доменін тұрақтандырушы элемент ретінде таңдаудың негізгі себептері оның төмен иммуногенділігі және биосәйкестігі болды. Коллагенінің XVIII типті тримеризациялық домені сүтқоректілерге тән ақуыз болғандықтан, фагтар немесе ашытқылардан алынған бөгде тримеризация домендеріне қарағанда адамдарда өзіне қатысты иммундық реакцияларды индукциялау қаупі төмен болуы мүмкін. Адам коллагенінің XVIII типті тримеризациялық доменімен модификацияланған рекомбинантты RABV-GE ақуызының сызбалық бейнесі 8-суретте көрсетілген.

Вирус RABV-G ақуызының эктодоменіндегі ықтимал бірігу ілмектерінің тізбектері (N-соңынын бастап санағанда 73–79 және 117–125 аралығында орналасқан аминқышқыл қалдықтары) гидрофобты аминқышқылдарына бай болып келеді. Бұл жағдай рекомбинантты ақуыздың ерітіндіде

агрегациялануына әкеліп, оның біртектілігін едәуір төмендетеді [134,135]. RABV-GE ақуызының болжамды бірігу ілмектері шамамен 17–19 аминқышқылынан тұрады, сондықтан гидрофобты аминқышқылдарын Gly-Gly-Ser-Gly-Gly линкеріне ауыстыру ақуыздың кеңістікте дұрыс бүктелуіне және антигендік қасиеттеріне әсер етпейді [136]. Жоғарыда аталған бірігу ілмектеріндегі аминқышқыл қалдықтарын алмастыру стратегиясы, оның ерігіштігін арттыру және кеңістікте дұрыс бүктелген RABV-GE эктодоменін алуға мүмкіндік беретіні ертеде анықталған [137]. Осыған орай, біз rRABV-G-XVIII генінде 73–79 және 117–125 жағдайларында орналасқан гидрофобты аминқышқылдарын Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (GGSGG) линкеріне, яғни гидрофильді аминқышқылдарына ауыстырдық. Бұл линкер, rRABV-GE экдодомені мен адамның коллагенінің XVIII типті тримерлеу доменінің арасына орналастырылды (8-сурет).

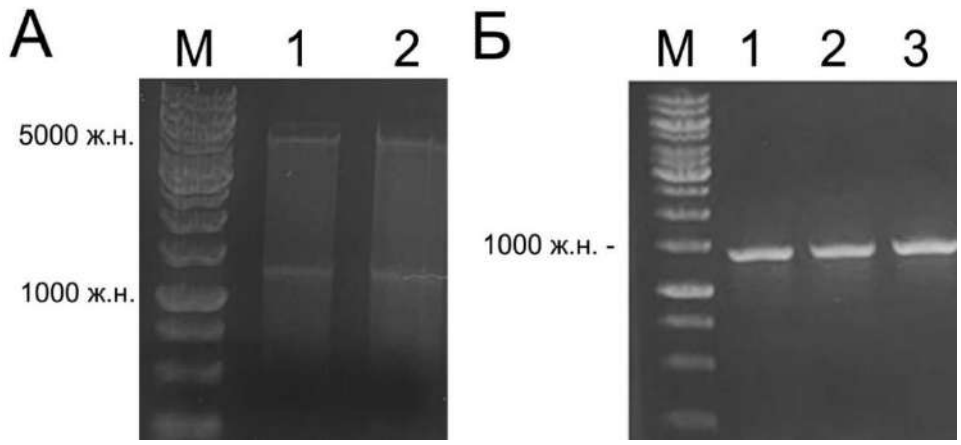


RABV-G - құтыру вирусының G гликопротеині. RABV-G келесі домендерден тұрады: SP – сигналды пептид, EC – эктодомен, TM – трансмембраналық домен, CT – цитозольдық домен. rRABV-GE - эктодомен конструкциясы, ол трансмембраналық (TM) және цитозольдық (CT) домендерді алып тастау арқылы жасалынды. rRABV-G-XVIII - модификацияланған тримерлі rRABV-GE, ол rRABV-GE ақуызының С-соңына коллагенінің XVIII типті тримерлеу доменін қысқа пептидті линкер арқылы қосу жолымен құрылды. Сонымен қатар, rRABV-GE және rRABV-G-XVIII конструкцияларында 73–79 және 117–125 жағдайларында орналасқан гидрофобты аминқышқыл қалдықтары GGSGG линкеріне ауыстырылған.

8-сурет – Рекомбинантты еритін RABV-G конструкциялары [126,130, 138].

Гидрофобты аминқышқыл қалдықтары өзгертілген rRABV-G-XVIII генінің нуклеотидтік тізбектері GeneCust Europe компаниясында (Дюделанж, Люксембург) синтезделді. Ген синтезіне дейін rRABV-G-XVIII кодтайтын нуклеотидтік тізбек *E. coli* жасушаларында тиімді экспрессиялануын қамтамасыз ету мақсатында кодондарды пайдалану жиілігі мен GC құрамына сәйкес

GenSmart™ Codon Optimization веб-сервері (https://www.genscript.com/gensmart-free-gene-codon-optimization. html) арқылы оңтайландырылды. rRABV-G-XVIII гені NcoI–XhoI сайттары бойынша pET-28c(+) векторына клондалып, нәтижесінде C-соңында His-tag тізбегі бар pET-28c-rRABV-G-XVIII экспрессиялық плазмидасы алынды. Содан соң pET-28c-rRABV-G-XVIII векторы *E. coli* Shuffle® T7 Express LysY штаммына (C3030) транформацияланды және канамицинге төзімді колониялар 37 °C температурада OD_{600}= 0,6 дейін өсірілді.GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, АҚШ) өндірушісінің хаттамасына сәйкес бөлініп алынған рекомбинантты плазмидалардың құрамында *rrabv-g-xviii* генінің бар-жоғын анықтау үшін генге спецификалық праймерлерді пайдалана отырып ПТР талдауы және рестрикциялық талдаулары жасалынды. Сынақ нәтижелері 1 % агарозды гелдегі электрофорез арқылы расталды (9А - сурет). 9А-суретте көрсетілгендей, pET-28c-rRABV-G-XVIII плазмидасын қамтитын клондар, 1 % агарозды гелде рестрикциялық эндонуклеазалар NcoI–XhoI-мен өңделгенде, шамамен 5,7 кб және шамамен 1,0 кб ұзындығындағы екі айқын жолақ береді. Бірінші жолақ *rrabv-g-xviii* гені жоқ pET-28c(+) плазмидасының ұзындығына сәйкес келсе, ал екінші жолақ *rrabv-g-xviii* генінің ұзындығына сәйкес келеді. Генге спецификалық праймерлерді және трансформанттардан бөлінген плазмидалық ДНҚ-ны пайдаланып жүргізілген ПТР негізіндегі талдау нәтижесі агарозды гел электрофорезі арқылы талданды. Гель-эектрофорезде клондалған *rrabv-g-xviii* генінің ұзындығына сәйкес келетін фрагмент анықталды. (9Б-сурет). Скрининг нәтижесінде рекомбинантты плазмидасы бар 5 колония анықталды.



А - Рекомбинантты pET-28c-rRABV-G-XVIII плазмидасын рестрикциялық талдау; В - Рекомбинантты pET-28c-rRABV-G-XVIII плазмидасын ПТР талдау; М: ДНҚ маркері; 1-3 клондар.

9-сурет – Трансформацияланған *E. coli* SHuffle клеткаларындағы рекомбинантты плазмидалық векторды рестрикциялық және ПТР әдісімен талдау.

Осылайша, rrabv-g-xviii гені pET-28c(+) экспрессиялық векторына сәтті клондалып, рекомбинантты pET-28c-rRABV-G-XVIII конструкциясы

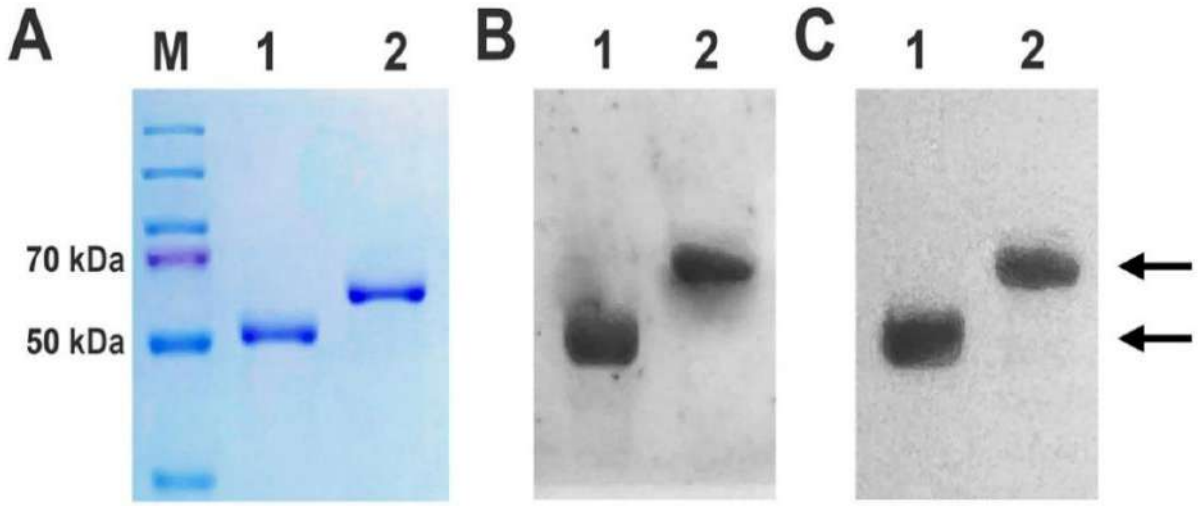
құрастырылды және трансформанттарда оның болуы рестрикциялық және ПТР талдаулары арқылы расталды.

3.1.2 rRABV-GE және rRABV-G-XVIII рекомбинантты ақуыздарын *E. coli* SHuffle экспрессиялық штамында экспрессиялау.

RABV-G ақуызының құрамында цистеин қалдықтары бар [127]. Олар дисульфидтік байланыстардың түзілуінде маңызды рөл атқарады, ал бұл байланыстар өз кезегінде ақуыздың құрылымдық тұрақтылығын қамтамасыз етеді. Алайда, дисульфидтік байланыстары бар ақуыздарды *E. coli* жасушаларында экспрессиялау қиындық туғызуы мүмкін, себебі *E. coli*-дің цитоплазмасы тотықсыздандырғыш орта болып табылады және дисульфидтік байланыстардың түзілуіне қолайсыз. Осы мәселені шешу үшін бұл ақуыз *E. coli* SHuffle жасушаларында экспрессияланды. Кәдімгі *E. coli* штамдарынан айырмашылығы, SHuffle жасушаларының цитоплазмасы дисульфидтік байланыстардың түзілуіне қолайлы етіп генетикалық түрлендірілген [139].

Алайда, ықтимал бірігу ілмектеріндегі гидрофобты аминқышқыл тізбектерінің алмастырылуына қарамастан, рекомбинантты ақуыздар жасушалық экстракттың ерімейтін фракциясында анықталды. Рекомбинантты ақуыздар толық ерімейтін фракцияда анықталғандықтан, еритін рекомбинантты ақуыз алу үшін әртүрлі қайта қаттау (refolding) әдістері сыналды. Инклюзиялық денешік (inclusion body) түрінде экспрессияланған рекомбинантты ақуыздар 8 М мочевина ерітіндісінде ерітіліп, никельге аффинді хроматография арқылы денатурациялаушы жағдайларда тазартылды. «Материалдар мен әдістер» бөлімінде сипатталғандай тазартудан кейін денатурациялаушы агенттің концентрациясын біртіндеп төмендету арқылы диализ жолымен қайта қаттау жүргізілді.

Ni-NTA аффинді хроматографиясы арқылы тазартылған rRABV-GE және rRABV-G-XVIII ақуыздарын ДСН-ПААГ арқылы талдау нәтижесінде Кумасси көгімен боялған гельде әр ақуызға сәйкес бір негізгі жолақ анықталды (10-сурет, А). Бұл рекомбинантты ақуыздардың салыстырмалы түрде жоғары тазалықта алынғанын көрсетті. rRABV-GE және rRABV-G-XVIII ақуыздары ДСН-ПААГ кезінде сәйкесінше шамамен 51 және 60 кДа молекулалық массасы бар жеке полипептидтер ретінде миграцияланды. rRABV-G-XVIII ақуызының жоғары молекулалық массасы оның құрамына коллагеннің XVIII типті тримерлену домені rRABV-GE ақуызының С-соңына қосылғанын көрсетеді. rRABV-GE және rRABV-G-XVIII рекомбинантты ақуыздарын Вестерн-блот әдісі арқылы талдау (инактивтелген құтыру вирусының CVS-11 штаммымен вакцинацияланған қоянның сарысуын пайдалану арқылы) рекомбинантты ақуыздардың вирусқа тән RABV-G ақуызымен антигендік ұқсастығын көрсетті (10-сурет, В). Сонымен қатар, rRABV-GE және rRABV-G-XVIII ақуыздарының Мус эпитопына қарсы моноклоналды антиденелермен байланысуы олардың құрамында Мус эпитопының бар екенін растады (10-сурет, С; 1-жол — rRABV-GE, 2-жол — rRABV-G-XVIII).



А) rRABV-GE (1) және rRABV-G-XVIII (2) ақуыздары денатурациялық жағдайда 10% ДСН-ПААГ полиакриламидті гельінде бөлінді. ДСН-ПААГ гелі Кумасси бояу ерітіндісімен боялып, кейін түссіздендіру ерітіндісінде шайылды. M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10–250 кДа (Thermo Scientific™). ДСН-ПААГ полиакриламидті гелі блоттау процесінен өткізілді және ақуыздар инактивтелген құтыру вирусынан алынған бақылау сарысуы (B) және Мус-ке қарсы моноклоналды антидене (C) арқылы анықталды.

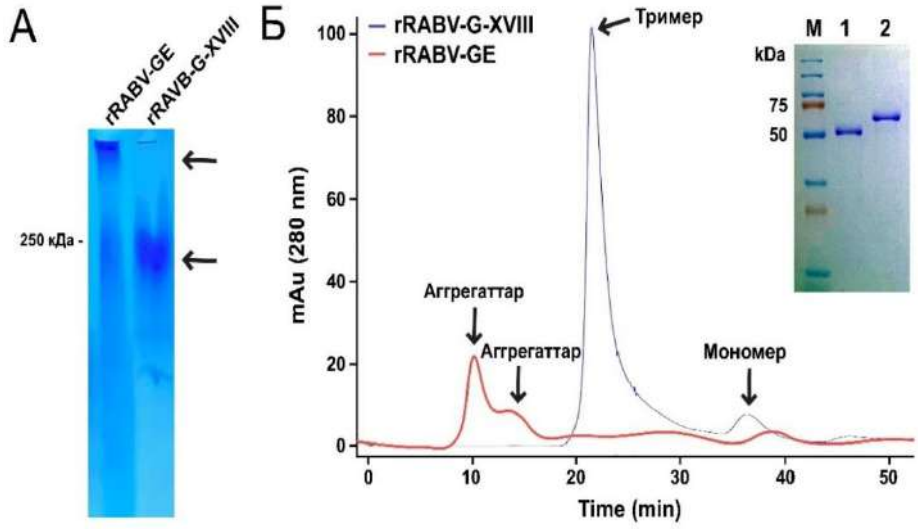
10-сурет-rRABV-GE және rRABV-G-XVIII рекомбинантты ақуыздарының экспрессиясы мен антигендік қасиеттерін талдау

rRABV-GE және rRABV-G-XVIII рекомбинантты ақуыздарының олигомерлік күйлерін зерттеу үшін нативті электрофорез жүргізілді. rRABV-GE жоғары молекулалық салмақты агрегаттар ретінде пайда болды (11A сурет- 1-жол), ал тримерлеу доменімен модификацияланған rRABV-G-XVIII тұрақтандырылған тримерлік құрылымды (250 кДа) көрсетті (11A сурет - 2-жол). Әрі қарай оларды Superose 12 10/300 GL колонкасын қолдана отырып, гель-фильтрациялық хроматография арқылы талдадық. Талдау шамамен 250 кДа аймағында негізгі шыңды көрсетті, ол 96,3% тримерлік ақуызды білдіреді, ал шамамен 61 кДа аймағындағы кіші шың мономерлік ақуыз ретінде анықталды (11-сурет). Ал тримерлену домені жоқ rRABV-GE гель-фильтрация кезінде агрегаттар түзді (11-сурет). Гель-фильтрация фракцияларының SDS-PAGE талдауы негізгі шыңда rRABV-G-XVIII бар екенін және оның 60 кДа мөлшеріндегі бір жолақ ретінде көрінетінін растады, ал агрегат шыңы rRABV-GE-нің молекулалық массасына (51 кДа) сәйкес келді.

Алынған нәтижелер *E. coli* жүйесінде экспрессияланған рекомбинантты RABV-G құрылымдарын сәтті қайта бүктеу (рефолдинг) және таза күйде бөліп алу, ерімейтін инклюзиялық денешіктерден функционалды гликопротеин домендерін еритін күйде қалпына келтірудің мүмкін екенін көрсетіп отыр. С-ұшында XVIII-типті коллагеннің тримеризациялық домені бар rRABV-G-XVIII конструкциясы рефолдинг нәтижесінде тұрақты еритін тримерлік кешендер

түзді. Ал мономерлі эктодомен конструкциясы rRABV-GE бірдей жағдайда ерітіліп, рефолдинг жүргізілуіне қарамастан, нативті электрофорез және гель-фильтрация хроматографиясы нәтижелері оның агрегацияға айқын бейімділік көрсететінін анықтады (11-сурет). Бұл айырмашылықтар маңызды қорытынды жасауға мүмкіндік береді: тримеризация доменінің болмауы мономерлі эктодоменнің ерітіндіде құрылымдық тұрғыдан тұрақсыз болуына әкелуі мүмкін.

Құтыру вирусының RABV-G ақуызының табиғи конформациясы тримерлі болып табылады және ол мембранаға трансмембраналық және цитозольдік домендері арқылы бектілген [26]. Біздің зерттеуімізде трансмембраналық және цитоплазмалық домендердің алынып тасталуы ақуыздың ерігіштігін арттырғанымен, оның мембранамен байланысқан табиғи тримерлік күйін тұрақтандыратын құрылымдық ортаны өзгертті. Нәтижесінде, rRABV-GE конструкциясының рефолдинг барысында нативті конформациясын толық қалыптастыра алмауы гидрофобты учаскелерінің сыртқы ортаға экспозициялануына әкеліп, ақуыздың агрегацияға бейімділігін арттыруы мүмкін.



А) NativePAGE™ Bis-Tris гелі. Олигомерлі күйді зерттеу үшін тазаланған мономерлі және тримерлі белоктар (әрқайсысы 5 мкг) 4-16% нативті гельге енгізілді. Б) Тазаланған мономерлі және тримерлі белоктарға Superose 12 10/300 GL колонкасында гель-фильтрациялық әдісімен анализ жасау. mAU-жұтылудың мини-бірліктері, М- алдын ала боялған белоктық маркер, 1-агрегацияланған фракцияның элюирленген үлгісі, 2- тримерлі фракцияның элюирленген үлгісі

11-сурет - rRABV-G-XVIII ақуызының олигомерлі күйін нативті PAGE және гель-хроматографияны қолдана отырып сипаттау [138].

XVIII коллагеннің С-терминалдық коллагенді емес доменінің (NC1) тримерлену аймағын rRABV-GE ақуызының С-ұшына қосу (rRABV-G-XVIII) тұрақты тримерлік құрылымның түзілуін қамтамасыз етті.

3.1.3 rRABV-GE және rRABV-G экспрессиялық ақуыздарының иммуногендігін салыстырмалы талдау.

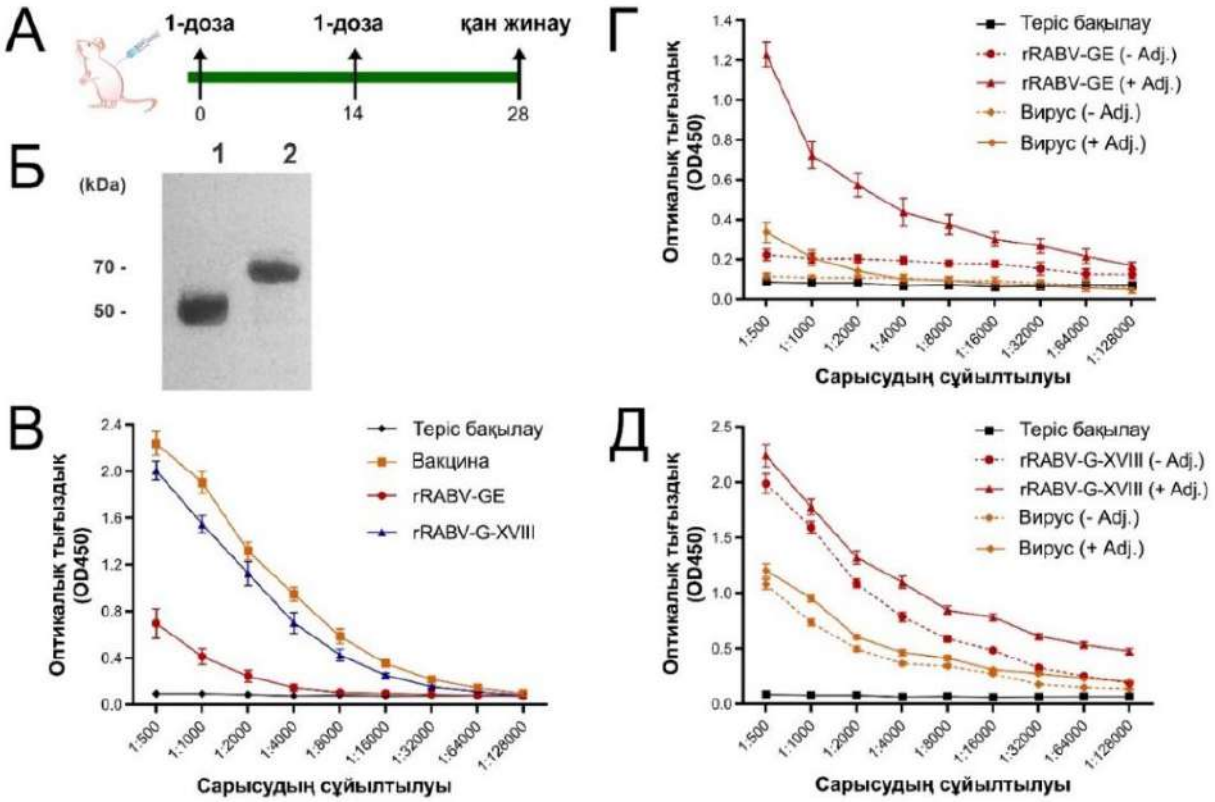
Құтыру вирусының гликопротеинінің тримерлік және мономерлік түрлерінің иммуногендігін зерттеу мақсатында тышқандар адъювантпен және адъювантсыз дайындалған рекомбинантты rRABV-GE немесе rRABV-G-XVIII ақуыздарымен 12А-суретте көрсетілген схема бойынша иммунизацияланды. Оң бақылау ретінде инактивтелген құтыру вирусына (CVS-11 штаммы) қарсы вакцина алынды. rRABV-GE және rRABV-G-XVIII ақуыздарын танитын антиденелердің бар-жоғын анықтау үшін инактивтелген RABV CVS-11 штаммымен иммундаудан кейін тышқандардан алынған поликлоналды сарысулары пайдаланылып, иммуноблоттинг жүргізілді. Сарысулар таза күйде бөлініп алынған rRABV-GE және rRABV-G-XVIII ақуыздарымен сыналды. Western blot нәтижесінде сәйкесінше шамамен 51 және 60 кДа молекулалық массалар аймағында айқын иммунореактивті жолақтар анықталды, бұл иммундалған тышқандардың сарысуларында rRABV-GE және rRABV-G-XVIII ақуыздарын танитын антиденелердің түзілгенін көрсетті (12Б-сурет). Иммундауға дейін алынған бақылау сарысуларында аталған аймақтарда спецификалық жолақтар байқалмады. Бұл нәтижелер rRABV-GE мен rRABV-G-XVIII ақуыздарының екеуі де нативті вирус ақуызы RABV-G-мен антигендік тұрғыдан ұқсас екендігін көрсетті, бұған екі рекомбинантты ақуызға да тән жоғары иммунореактивтілік дәлел болды (12Б-сурет).

Бустерлік дозадан кейін 14-күні жиналған сарысу үлгілері антиденелік жауаптың деңгейі мен ерекшелігін анықтау мақсатында жанама ИФТ арқылы талданды. Тазартылған құтыру вирусы антиегенімен қапталған планшеттерде инактивтелген құтыру вирусына қарсы вакцинаны алған топтың сарысулары күткендей ең жоғары титрлерді көрсетті.

Инактивтелген құтыру вирусымен вакциналанған тышқандардың сарысулары rRABV-GE ақуызына қарағанда rRABV-G-XVIII ақуызына әлдеқайда жоғары реактивтілік танытты (12В-сурет). Соңғы нүктелік талдау нәтижелері вакциналанған және rRABV-G-XVIII топтарындағы титрлердің 1:64 000 деңгейіне жеткенін көрсетті, ал rRABV-GE тобында бұл көрсеткіш 1:8000 мәнінен аспады ($OD_{450} \geq 0,1$ шегі). Бұл нәтиже rRABV-GE мономерлі ақуызына бағытталған антиденелік жауаптың rRABV-G-XVIII тримерлі ақуызымен салыстырғанда төмен болғанын көрсетеді.

Иммунизацияға дейін алынған тышқандардың сарысулары теріс бақылау ретінде пайдаланылды. Соңғы титрлер жақшаларда көрсетілген. Соңғы титр $OD_{450} \geq 0,1$ критерийіне сәйкес келетін сарысудың ең жоғары сұйылту дәрежесі ретінде анықталды. Антигендік ерекшелігін және айқаспалы реактивтілігін одан әрі зерттеу мақсатында антиденелердің рекомбинантты ақуыздармен және

тазартылған вируспен байланысу қабілеті ИФТ арқылы бағаланды (12 Г, Д суреттері).



(А**)** Тышқандарды рекомбинантты rRABV-GE (эктодомен, 30 мкг) және rRABV-G-XVIII (30 мкг) ақуыздарымен, адъюванттың қатысуымен немесе қатысуынсыз иммунизациялау сызбасы. Бірнеше тышқан екі рет коммерциялық инактивтелген құтыру вирусына қарсы вакцинамен (CVS-11 штаммы) егілді. (Б) rRABV-GE (жолақ 1) және rRABV-G-XVIII (жолақ 2) ақуыздарын инактивтелген құтыру вирусына қарсы поликлоналды сарысуларды пайдаланып жүргізілген Вестерн-блот талдауы. (В) rRABV-GE, rRABV-G-XVIII және тазартылған вирусқа қарсы алынған сарысулардағы антиденелер титрі. (Г) rRABV-GE-ге қарсы алынған сарысулардағы антиденелер титрі, антиген ретінде rRABV-GE және тазартылған вирус қолданылған жағдайда. (Д) rRABV-G-XVIII-ге қарсы алынған сарысулардағы антиденелер титрі, антиген ретінде rRABV-G-XVIII және тазартылған вирус қолданылған жағдайда [138]

12-сурет - Тримерлі rRABV-G-XVIII ақуызының гуморальдық иммундық жауапты индукциялау қабілеті

Адъювантпен бірге енгізілген rRABV-GE тобының сарысулары гомологтық антигенге жоғары реактивтілік көрсетті, бірақ вирус антигендеріне қатысты айқаспалы реактивтілік шектеулі болды. Бұдан бөлек, адъювант қосылған кезде

антидене титрінің шамалы жоғарылағаны байқалды. Антидене титрлері rRABV-GE-ге қарсы 1:128 000 деңгейіне жеткенімен, вирус антигеніне қатысты жауап төмен (≤ 1:4000) болып қалды, бұл мономерлі пішіннің шектеулі спецификалығын айқындайды. Бұл мәліметтер мономерлі rRABV-GE ақуызы табиғи белокқа ұқсастығының аздығын немесе иммундық жүйе басым танитын эпитоптардан аз ерекшеленетін құрылымдарды көрсетуі мүмкін екенін болжайды. Керісінше, rRABV-G-XVIII ақуызымен иммунизацияланған сарысулар rRABV-G-XVIII-дің өзіне жоғары реактивтілік танытып қана қоймай, нативті вирус антигенін де айқын айқаспалы тану қабілетін көрсетті.

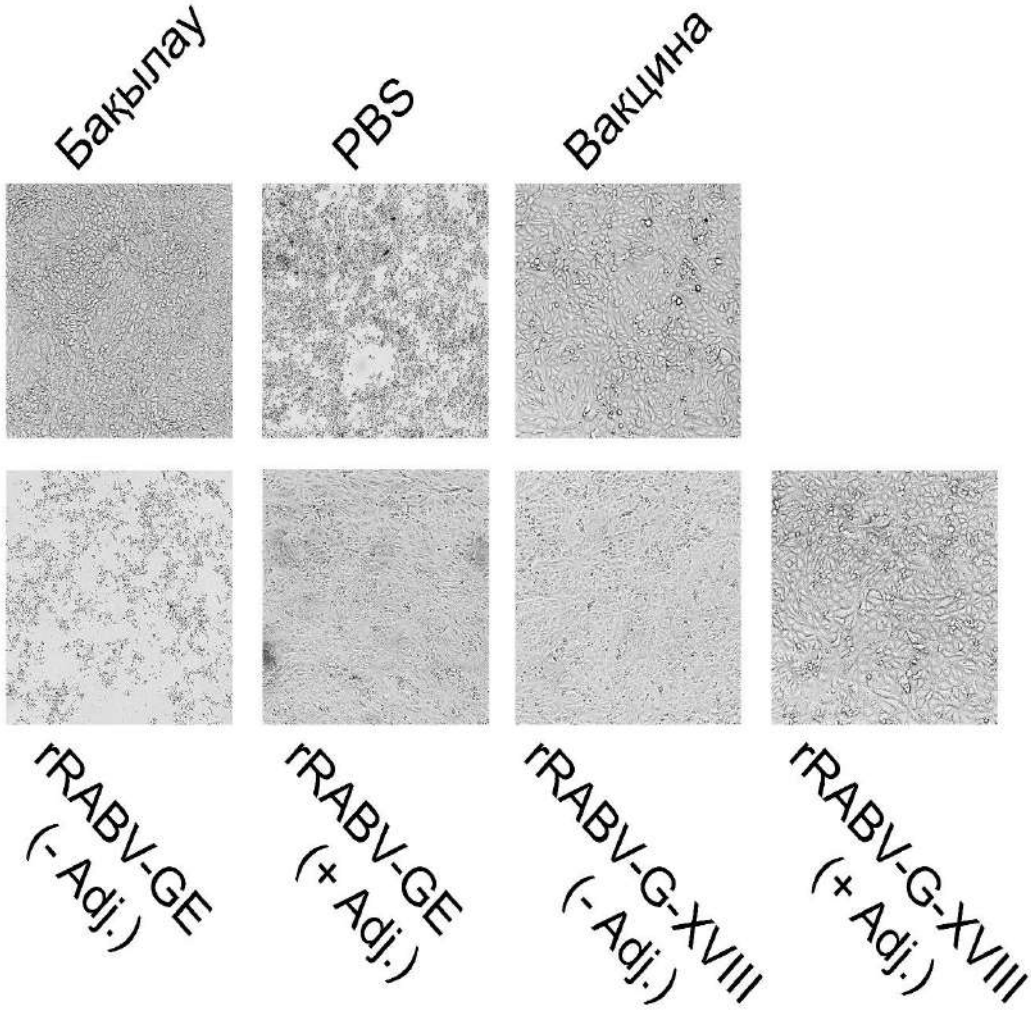
Алынған нәтижелер адъюванттың қосылуы rRABV-G-XVIII ақуызының иммуногенділігіне айқын ықпал етпегенін көрсетті, өйткені спецификалық антиденелердің титрі адъювант қолданылған және қолданылмаған топтардың екеуінде де жоғары деңгейде болды (12Д суреті). Бұл топтағы антидене титрлері рекомбинантты және вирус антигендеріне қарсы тұрақты түрде 1:128 000 деңгейіне дейін жетті. Бұл нәтиже rRABV-G-XVIII тримерлі ақуызының нативті вирус антигенімен жоғары реактивтілігін және оған тән антигендік детерминанттарды сақтайтынын көрсетеді. Осылайша, алынған деректер rRABV-G-XVIII тримерлі ақуызының нативті вирус антигенін тиімді танитын жоғары деңгейдегі гуморалдық иммундық жауап қалыптастыратынын көрсетеді.

Алынған нәтижелер коллаген XVIII тримерлеу доменін пайдалану арқылы құтыру вирусы гликопротеинінің тримерлік құрылымын қалыптастырудың иммуногендік тұрғыдан артықшылығын көрсетеді. rRABV-G-XVIII конструкциясы адъювантсыз енгізілген жағдайда да нативті вирус антигенін тиімді танитын жоғары деңгейдегі гуморалдық иммундық жауап қалыптастырды. Бұл нәтижелер rRABV-G-XVIII конструкциясын перспективалы суббірліктік вакцина кандидаты ретінде әрі қарай зерттеуге негіз береді.

Вирусты бейтараптандыру белсенділігін бағалау мақсатында rRABV-GE және rRABV-G-XVIII ақуыздарымен иммундаған тышқандардан алынған сарысу үлгілері цитопатикалық әсерге (ЦПӘ) негізделген бейтараптандыру сынағы арқылы зерттелді. RABV CVS-11 штамының цитопатикалық әсерін бейтараптандыру қабілетін анықтау үшін сарысу үлгілері 100 $ТЦД_{50}$ дозасындағы RABV CVS-11 штамымен тең көлемде араластырылып, 37 °C-та 2 сағат инкубацияланды. Алынған қоспалар 96-ұяшықты планшетте өсірілген Vero жасушаларына енгізілді. Цитопатикалық әсердің пайда болуы күн сайын бақыланды. ЦПӘ-нің алғашқы белгілері жұқтырудан кейін шамамен 72 сағаттан соң байқалды. Бейтараптандыру титрінің соңғы мәні жұқтырудан кейінгі 6-күні анықталды, бұл кезде вирустық бақылауға арналған ұяшықтарда толық ЦПӘ байқалды. Бейтараптандыру титрі ЦПӘ-нің толық тежелуін қамтамасыз еткен сарысудың ең жоғары сұйылту дәрежесі ретінде анықталды. ЦПӘ нәтижелері мен CVS-11 штамына қарсы бейтараптандыратын антиденелер титрлерінің нәтижелері 13-суретте және 7-кестеде көрсетілген.

13-суретте rRABV-GE және rRABV-G-XVIII ақуыздарымен бұлшықетішілік иммундаудан кейін алынған құтыру вирусына қарсы сарысу

үлгілерінің Vero жасуша культурасында құтыру вирусын *in vitro* жағдайында бейтараптандыру белсенділігі көрсетілген. Вакцина қабылдаған тышқандардан алынған сарысулар оң бақылау, ал PBS енгізілген тышқандардың сарысулары теріс бақылау ретінде пайдаланылды. Нәтижесінде rRABV-GE және rRABV-G-XVIII ақуыздарымен иммундаған тышқандардан алынған сарысу үлгілерінің құтыру вирусы индукциялаған цитопатикалық әсерді тежеп, жасушалардың зақымдануын төмендеткені байқалды. Бұл нәтижелер иммундалған тышқандардың сарысуларында құтыру вирусын бейтараптандыратын антиденелердің түзілгенін көрсетеді. Цитопатикалық әсер жарық микроскопиясы арқылы ×200 үлкейту кезінде бағаланды.



13-сурет – rRABV-GE және rRABV-G-XVIII ақуыздарымен иммундаудан кейін алынған құтыру вирусына қарсы сарысу үлгілерінің Vero жасушаларындағы құтыру вирусын *in vitro* жағдайында бейтараптандыру белсенділігі (1:64 сұйылту, ×200) [138]

CVS-11 штаммының инактивтелген құтыру вирусымен иммундаудан кейін алынған сарысу оң бақылау ретінде қолданылып, бейтараптандыру титрі 1:512 болды. rRABV-GE және rRABV-G-XVIII ақуыздарымен иммундаған тышқандардан алынған сарысу үлгілері де CVS-11 штамына қарсы вирусты бейтараптандыру белсенділігін көрсетті. ИФТ нәтижелеріне сәйкес, адъювант қолданылған және қолданылмаған rRABV-G-XVIII топтарында бейтараптандыру титрі бірдей болып, 1:512 деңгейіне жетті. Адъювантсыз rRABV-GE тобында бейтараптандыру титрі 1:32-ден төмен болды, ал адъювант қолданылған rRABV-GE тобында титр 1:64-ке жетті. Бұл нәтижелер ИФА арқылы анықталған реактивтілік үрдісімен сәйкес келіп, rRABV-G-XVIII ақуызының CVS-11 штамына қарсы функционалдық бейтараптандыратын антиденелердің жоғары титрін қалыптастыратынын көрсетті. Алынған деректер rRABV-G-XVIII конструкциясын құтыруға қарсы перспективалы суббірліктік вакцина кандидаты ретінде одан әрі зерттеуге негіз береді.

7-кесте - CVS-11 вирусына қарсы нейтрализдеуші антиденелердің титрлік көрсеткіштері.

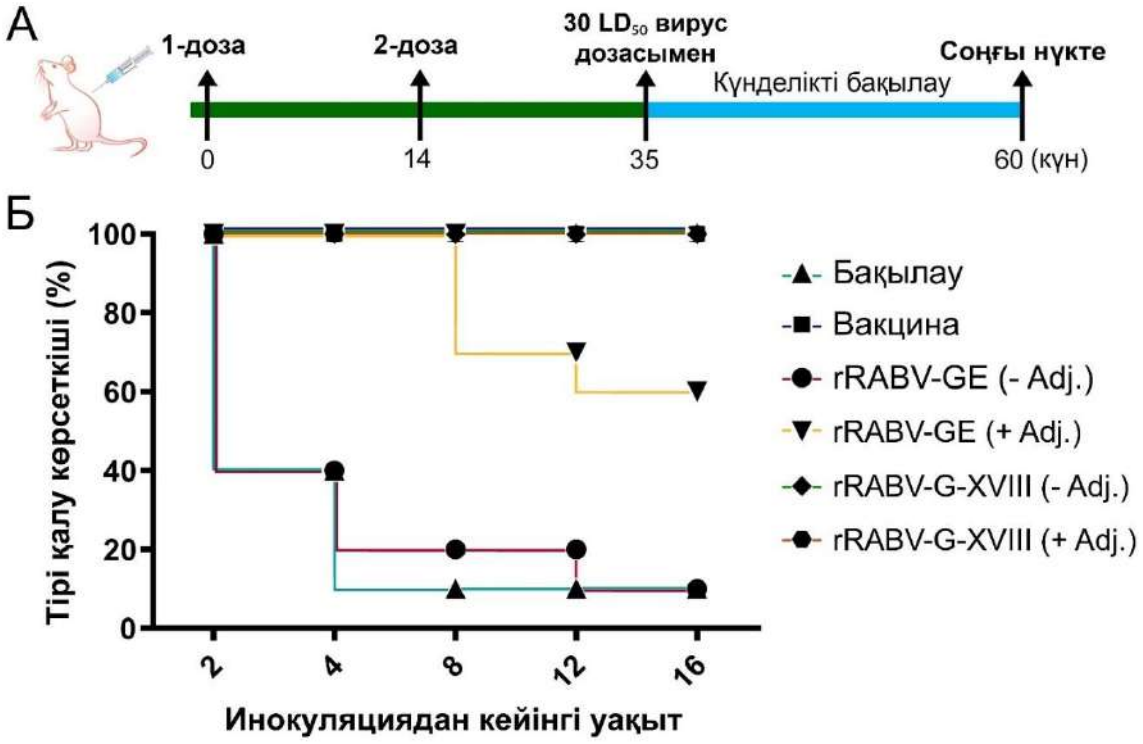
Иммуноген	Титр
Вакцина сарысуы	1:512
rRABV-GE (-адьювант)	≤1:32
rRABV-GE (+адьювант)	1:64
rRABV-G-XVIII (адьювант)	1:512
rRABV-G-XVIII (+адьювант)	1:512

rRABV-GE және rRABV-G-XVIII кандидат вакциналарының құтыру вирусының инфекциясынан *in vivo* қорғау тиімділігі бағаланды (14-сурет). Осы мақсатта BALB/c тұқымдас тышқандарға rRABV-GE және rRABV-G-XVIII ақуыздары адъювантпен және адъювантсыз екі рет (0 және 14-күндері) бұлшықет ішіне енгізілді. Иммундаудан кейін 35-күні барлық тәжірибелік және бақылау топтары CVS-27 құтыру вирусының 30 $ЛД_{50}$ дозасымен ми ішіне енгізу арқылы жұқтырылды. Жануарлардың өмір сүру көрсеткіші 25 күн бойы бақыланып, нәтижелер өмір сүру қисықтары түрінде ұсынылды (14А сурет). Салыстыру үшін тәжірибеге вакцинамен иммундалған оң бақылау және PBS енгізілген теріс бақылау топтары енгізілді.

PBS енгізілген бақылау жануарларының барлығы CVS-27 құтыру вирусын ми ішіне жұқтырғаннан кейін 5–8 күн ішінде құтыру инфекциясынан өлді. Құтырудан өлген тышқандарда әдеттегі клиникалық белгілер байқалды: жүнінің үрпиюі, бүкірейіп жүру, құйрығының қайырылуы, әлсіздік және артқы аяқтарының салдануы. Өлімге әкелетін инфекциядан кейін иммундалған тышқандардың өмір сүру деңгейі индуцирленген антиденелердің деңгейімен және цитопатикалық әсер (ЦПЭ) негізінде бағаланған вирусты бейараптандыру

қабілетімен тығыз байланысты болды. RABV-GE арқылы иммундалған тышқандардың тек 20%-ы ғана өлімге әкелетін инфекциядан аман қалды. Алайда, вакцинаның құрамына Фрейнд адъювантын енгізу бұл топтағы өмір сүру көрсеткішін 20%-дан 60%-ға дейін арттырды. Адъювантпен де, адъювантсыз да енгізілген rRABV-G-XVIII ақуызы өлімге әкелетін инфекциядан 100% тірі қалуды қамтамасыз етті, бұл тримерлік конфигурацияның иммуногендік артықшылығын көрсетеді(14-сурет).

Бақылау ретінде қолданылған инактивтелген құтыру вирусына қарсы вакцина (CVS-27 штаммы) да иммундалған тышқандарды 100% қорғады. 14Б-суреттегі өмір сүру қисықтарының талдауы rRABV-G-XVIII ақуызының қорғаныш белсенділігі референттік вакцина деңгейімен салыстырмалы бірдей екенін көрсетті.



(А) Эксперименттік схема (Б) Иммундау жүргізілген және бақылау топтарының өмір сүру қисықтары

14-сурет - Құтыру вирусының өлімге әкелетін дозасымен жұқтырылғаннан кейін иммундау жүргізілген тышқандардың өміршеңдігі

Құтыруға қарсы вакциналар саласында соңғы жылдары иммуногенділікті арттыру үшін құрылымдық ерекшеліктерді ескеретін дизайнға, әсіресе тримермен немесе префьюжн күйінде тұрақтандырылған гликопротеиндерді қолдануға бағытталған зерттеулер жүзеге асырылуда. Мысалы суббірлікті вакциналардың иммундық жауабын күшейту мақсатында GCN4 негізіндегі

(ашытқының транскрипция факторынан алынған) изолейцинді «найзағай» мотиві және T4 бактериофагының фибритин foldon тримеризация домені кеңінен қолданылады [27–30]. GCN4 және foldon негізіндегі домендердің ақуыздың тримерлік құрылымын қалыптастыруға ықпал ететіні және осындай құрылымдық ұйымдасу антигеннің иммуногендігін арттыра алатыны көрсетілген [31]. GCN4 және foldon негізіндегі домендер адам ағзасы үшін бөгде ақуыздық құрылымдар болғандықтан, оларға қатысты адам ағзасында иммундық реакция туындауы мүмкін. Осыған байланысты бөгде тримеризация домендері сияқты вакцинаның құрамдас бөліктеріне қарсы күшті иммундық жауаптың дамуы проблема тудыруы мүмкін, себебі ол иммундық жауаптың негізгі нысаны-антигенге бағытталуын төмендетуі мүмкін. Бұл антиденелердің негізінен тірек немесе тасымалдаушы құрылымға, яғни тримерлену доменіне қарсы түзілуіне әкеліп, вакцинаның жалпы тиімділігін төмендетуі мүмкін.

Адамның XVIII типті коллагенінің доменін тримеризацияны қамтамасыз ететін элемент ретінде таңдауымыздың негізгі себептерінің бірі — оның адам ақуызына негізделуі және бөгде ақуыздық домендермен салыстырғанда иммуногенділігінің төмен болу мүмкіндігі. Жиі қолданылатын бактериялық немесе вирустық тримеризация домендерінен айырмашылығы, адамның XVIII типті коллаген домені тұрақтандырушы элементінің өзіне қарсы иммундық жауап тудыру ықтималдығы төмен, бұл вакциналық конструкцияларды әзірлеу тұрғысынан маңызды артықшылық болып табылады.

Алынған деректер құтыру вирусының гликопротеинінің эктодоменін тримерлеу оның иммуногендік қасиеттері мен қорғаныш қабілетін айтарлықтай жақсартатынын көрсетеді. rRABV-G-XVIII конструкциясы келесі буын құтыруға қарсы суббірлікті вакцина кандидаты ретінде қарастыруға негіз береді.

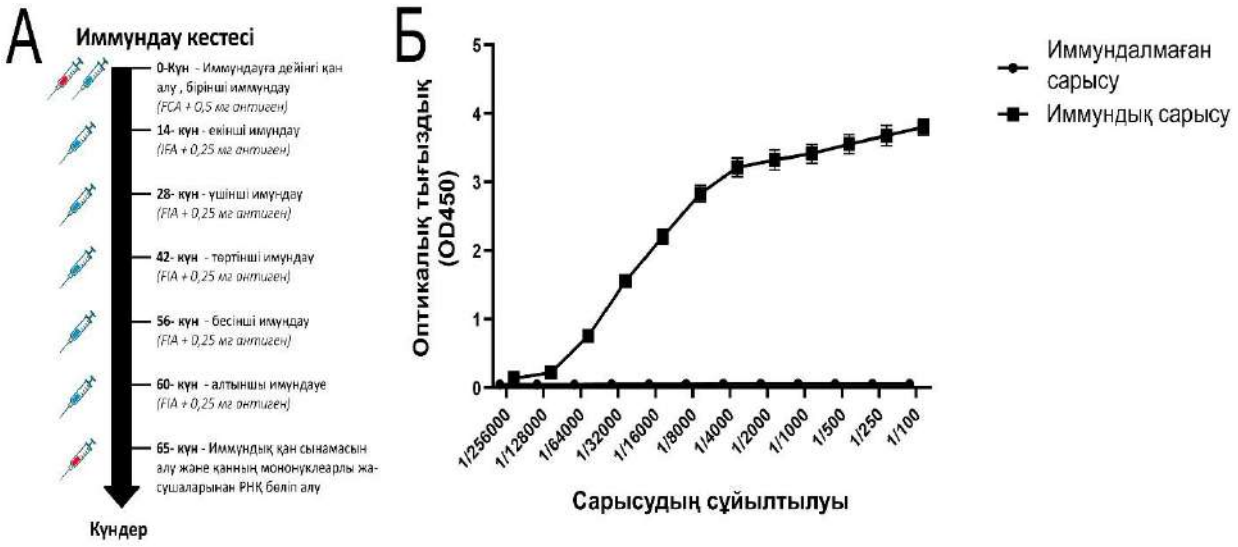
3.2. RABV-G-XVIII-ге спецификалық наноантиденелердің кДНҚ-VHH (нанодене) кітапханасын фагтық дисплей әдісімен құрастыру және олардың селекциясы

3.2.1 Иммундық наноантидене кітапханасын құрастыру

Құтыру вирусының гликопротеині G (RABV-G) вирус бетінде орналасқан негізгі құрылымдық және иммуногенді ақуыз болып табылады әрі вирусты бейтараптандыратын антиденелердің негізгі нысанасы саналады [126,129]. Осыған байланысты зерттеудің алдыңғы кезеңінде алынған rRABV-G-XVIII рекомбинантты тримерлік ақуызы дромедар түйесін иммундау үшін қолданылды.

rRABV-G-XVIII ақуызына бағытталған наноантиденелерді алу үшін түйеге 15-суретте көрсетілген схема бойынша иммундау жүргізілді. Үш жастағы еркек дромедар түйеге 500 мкг rRABV-G-XVIII және толық Фрейнд адъювантының (1:1 көлемдік қатынаста) қоспасы енгізілді (15A-сурет). Кейінгі иммундау сатыларында ақуыз бен толық емес Фрейнд адъювантының қоспасы қолданылды. Иммундау алдындағы сарысу теріс бақылау ретінде жиналды. Бесінші иммундаудан кейін жеті күн өткен соң 100 мл перифериялық қан үлгісі алынып, одан лимфоциттер бөлініп алынды. Сонымен қатар, сарысу үлгісі

жиналып, rRABV-G-XVIII ақуызына қарсы спецификалық антиденелер титрі ИФТ әдісімен өлшенді (15Б-сурет). Иммундық сарысу rRABV-G-XVIII ақуызына қарсы жоғары иммундық жауап көрсетті. Иммундауға дейінгі сарысуда антиденелердің деңгейі фондық деңгейде болды. Бес мәрте иммундандыру нәтижесінде бір өркешті түйенің сарысуындағы rRABV-G-XVIII-ке спецификалық антиденелердің соңғы титрі 1:128 000-нан жоғары болды, бұл түйенің rRABV-G-XVIII ақуызына күшті иммундық жауап қалыптастырғанын дәлелдейді.

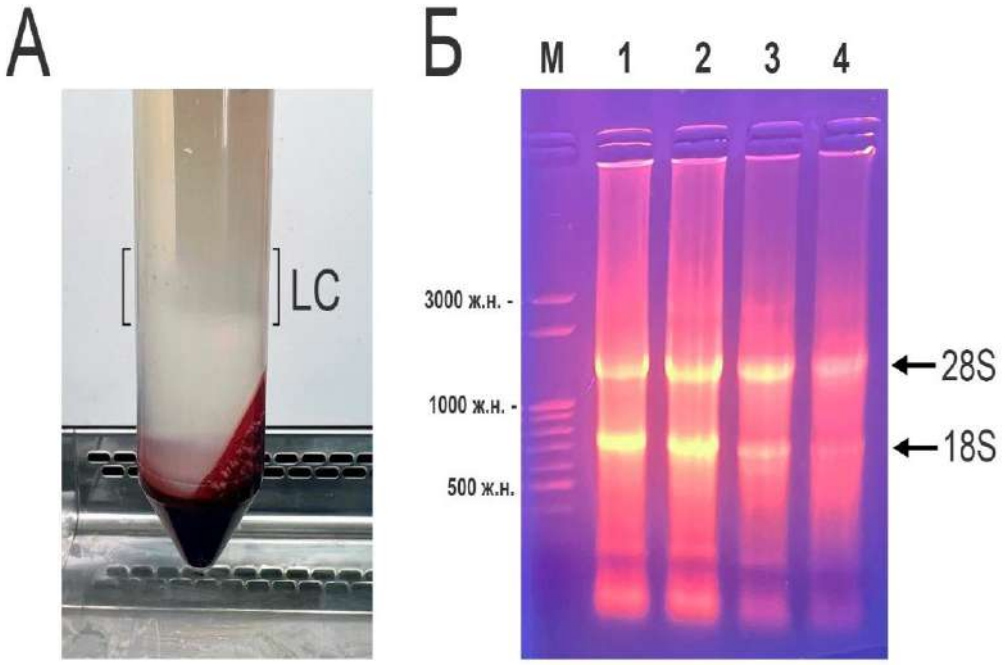


(А) Түйені rRABV-G-XVIII антигенімен иммундау кестесі. Сарысу және қан үлгілерін алудың уақыт нүктелері көрсетілген. кДНҚ негізіндегі VHH кітапханасын құру үшін перифериялық қанның мононуклеарлы жасушаларын (PBMC) оқшаулау уақыты белгіленген. (Б) Кезекті иммундаулардан кейінгі rRABV-G-XVIII антигеніне спецификалық сарысулық IgG жауабы (65-күн). ИФТ кезінде өлшенген оптикалық тығыздық (OD_{450}) мәндері антигенге спецификалық IgG байланысуын көрсетеді және қайталама өлшеулердің орташа мәні ретінде берілген; вариация 5%-дан төмен болды.

15-сурет – Түйе иммунизациясы және антигенге тән антидене реакцияларын индукциялау.

Түйеде иммундық жауаптың қалыптасқаны анықталғаннан кейін, перифериялық қаннан мононуклеарлы жасушалар Ficoll-Paque PLUS тығыздық градиенті әдісімен бөлініп алынды. Одан кейін TRIzol реагентінің көмегімен жалпы РНҚ бөлініп алынды. Алынған РНҚ-ның тазалығы мен сапасы спектрофотометриялық талдау және агарозды гель-электрофорез арқылы бағаланды. rRABV-G-XVIII ақуызына қарсы бірдоменді антиденелер

панелін алу мақсатында мононуклеарлы жасушалардан бөлініп алынған жалпы РНҚ-дан кері транскрипция арқылы кДНҚ синтезделді (16А және 16Б-суреттер).



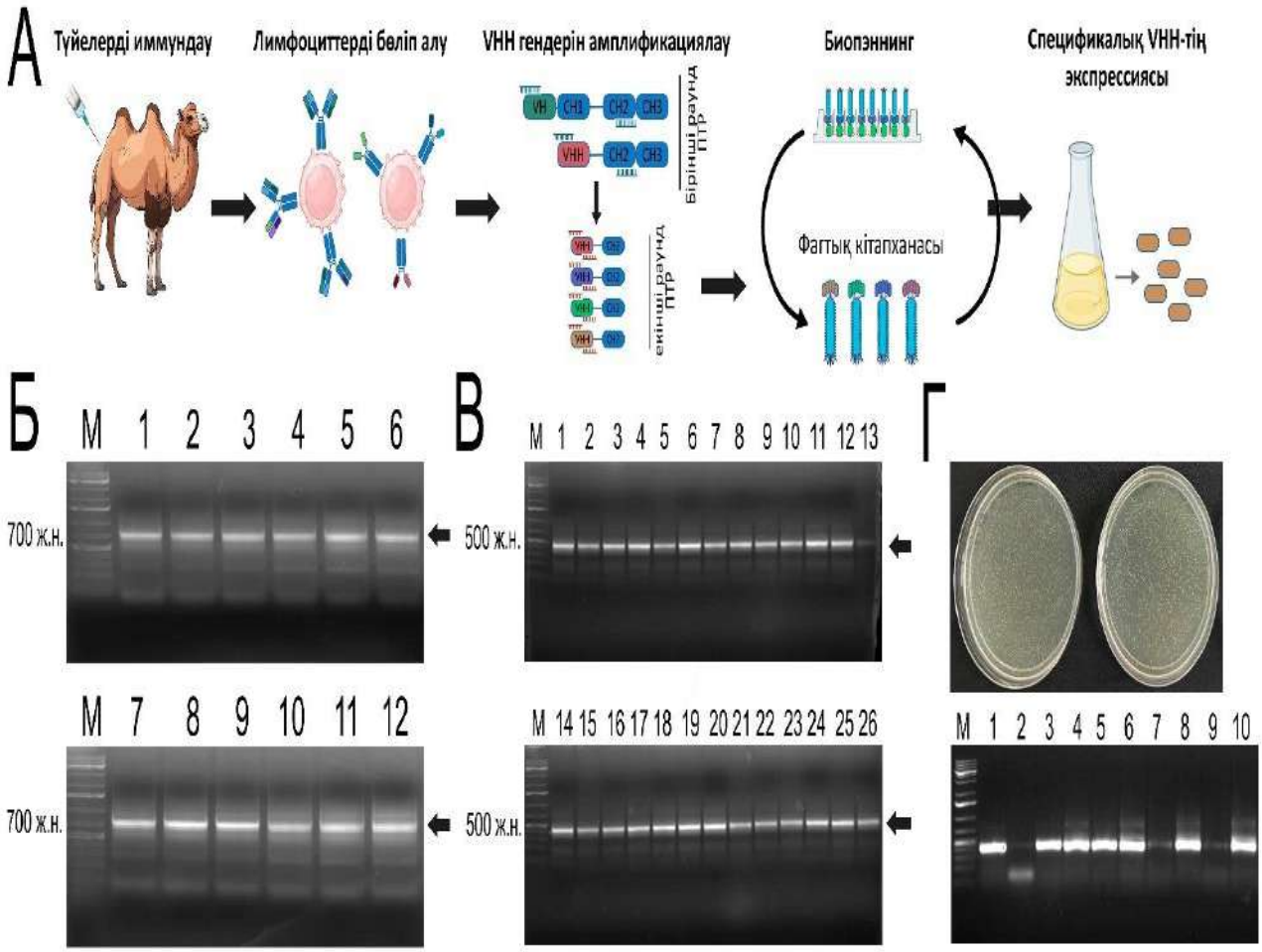
А) Шеткері қан лимфоциттерінің қабаты (LC); В) Түйе лимфоциттерінен бөлінген жалпы РНҚ (1–4 үлгілер) кері транскрипция арқылы кДНҚ-ға айналдырылып, nested ПТР үшін матрица ретінде пайдаланылды. М — ДНҚ маркері 100 ж.п. + 1,5 кб + 3 кб (SibEnzyme);

16-сурет – Лимфоциттерді және жалпы РНҚ-ны бөліп алу [126]

Nested ПТР нәтижесінде классикалық антиденелерге тән VH (~700 ж.н.) және бірдоменді антиденелерге тән VHH (~500 ж.н.) екі түрлі ампликон анықталды. Бұл нәтиже түйенің иммундық жүйесінде бірдоменді антиденелерге бағытталған иммундық жауаптың қалыптасқанын көрсетеді. Бұл Camelidae тұқымдасына тән биологиялық ерекшелік болып табылады және наноантиденелер алудың негізгі биологиялық артықшылығы саналады [80,81].

Наноантидене кітапханасын құру сызбасы 17А-суретте көрсетілген. Ауыр тізбекті антидененің вариабельді аймағының (VHH деп те аталады) тізбектері түйенің перифериялық қанның мононуклеарлы жасушаларынан алынған кДНҚ молекуласынан амплификацияланады. Бірінші раундтағы ПТР өнімдері агарозды гель-электрофорезі арқылы талданды: онда VHH-CH2 экзондары үшін 700 жұп нуклеотид фрагменттері анықталды (17Б сурет). Гельдің шамамен 700 ж.н. аймағынан тиісті ДНҚ фрагменттері кесіліп алынды, ал алынған ДНҚ екінші ПТР үшін үлгі ретінде пайдаланылды. Бұл процесс nest-PCR2 up және nest-PCR2

down праймерлерімен жүргізілді. Нәтижесінде шамамен 500 ж.н болатын VHH доменінің гені амплификацияланды (17В-сурет).



А) Түйелерді біріктірілген антигенмен иммундау, лимфоциттерді бөліп алу, VHH гендерін амплификациялау, фагтық дисплей кітапханасын құрастыру және антиген-спецификалық VHH экспрессиясын қамтитын жұмыс барысының жалпы сызбалық көрінісі. (Б) 900 ж.н. және 700 ж.н. жолақтарын көрсететін ПТР-дің бірінші кезеңінде VHH фрагменттерін ампифликациялау (В) шамамен 500 ж.н. болатын VHH фрагменттерінің ПТР-дің екінші кезеңінде ампифликациялануы (Г) Лигирлеу және трансформациядан кейін VHH кірістірмелері бар рекомбинантты клондардың үлесін бағалау мақсатында кездейсоқ таңдалған клондарға ПТР талдауын жүргізу.

17-сурет - Құтыру вирусының гликопротеині (G) мен XVIII типті коллаген доменінімен біріктірілген ақуызына қарсы VHH фагтық дисплей кітапханасын құрастыру.

rRABV-G-XVIII-ге қарсы VHH кітапханасы соңғы ПТР фрагменттерін pADL23c Phagemid (Antibody Design Labs™, Сан-Диего, АҚШ) векторына енгізу және одан кейін M13KO7 көмекші фагының көмегімен фаг бөлшектерін түзу

арқылы жүзеге асырылды. Рекомбинантты фагмидтерді TG1 *E. coli* компетентті жасушаларына трансформациялау нәтижесінде көлемі 5 × 10^6 фагмидтен тұратын кітапхана алынды (17-сурет). VHH домендерін фаг бетінде экспонаттайтын фагтық бөлшектерді алу үшін кітапхана құрамындағы TG1 *E. coli* жасушалары M13KO7 көмекші фагымен инфекцияланды. M13KO7 фагы фагмидтің репликациялануы мен фагтық бөлшектердің түзілуіне қажетті қосымша ақуыздарды қамтамасыз етті. Шамамен 1x10^9 фагтық бөлшектер шамамен 1×10^8 *E. coli* жасушаларымен инкубацияланды. Спецификалық Nb-фагтарды сұрыптау 96 ұяшықты микротитрлік планшеттің ұяшықтарын рекомбинантты rRABV-G-XVIII ақуызымен пассивті қаптау арқылы жүргізілді. Фаг кітапханасын қосып, инкубациядан кейін, әрбір паннинг раундынан соң байланыспаған фагтық бөлшектерді толық жою үшін жуу кезеңдерінің саны арттырылды. rRABV-G-XVIII-ге қарсы спецификалық Nb-фагтарды іріктеу үшін триэтиламин көмегімен элюциялау әдісі қолданылды (бұл «Материалдар мен әдістер» бөлімінде сипатталған). Элюцияланған фагтар экспоненциалды фазадағы TG1 бактерияларын инфекциялау үшін пайдаланылды, содан кейін 37°C температурада бір сағат бойы инкубацияланып, ампициллин мен глюкоза бар 2×YT агарлы табақшаларына градиенттік сұйылту әдісімен себілді. Кітапхананың көлемі колониялар санын санау арқылы анықталды. Иммундық кітапхананың көлемі 5,1 × 10^4 КОЕ құрады. Кездейсоқ таңдалған 10 колонияға жүргізілген колониялық ПТР талдауы фагмидтердің 80%-ында шамамен 400 ж.н. болатын кірістірмелері бар екенін, яғни VHH гендері бар екендігін көрсетті. Үш раундтық паннингтен кейін rRABV-G-XVIII-ге спецификалық VHH бар фагтар байытылды (8-кесте).

8-кесте- Биопэннинг процесі кезіндегі фагтардың байытылуы

Пэннинг кезеңдері	Енгізілген фагтар саны (PFU)	Элюцияланған фагтар саны (PFU)	Қатынасы (%)
1	6.0×10^9	6.1×10^4	1.0×10^{-5}
2	4.0×10^9	5.2×10^6	1.3×10^{-4}
3	3.0×10^9	7.3×10^6	2.4×10^{-3}

Аффинділігі жоғары VHH наноантиденелерін және оларды кодтайтын ДНҚ тізбектерін бөліп алу мақсатында биопэннингтен кейінгі кітапханадан кездейсоқ таңдалған 80 жеке фагтық клон ИФТ әдісімен талданды. Ол үшін наноантиденелердің экспрессиясы ИПТГ көмегімен индукцияланып, PE-ELISA жүргізу үшін периплазмалық экстрактілер (PE) алынды. 80 клонның ішінен rRABV-G-XVIII ақуызымен спецификалық байланысатын 5 оң клон анықталды (18A-сурет). Барлық 5 оң клон ИФА кезінде қапталмаған ұяшықпен салыстырғанда оптикалық тығыздықтың кемінде 2 есе жоғары мәнін көрсетті (18A-сурет). Осы 5 клонның ішінен одан әрі зерттеу үшін 2 клон таңдап алынды. Таңдалған екі клоннан rRABV-G-XVIII-ге спецификалық VHH гендерін анықтау

мақсатында колониялық ПТР жүргізілді. ПТР өнімдерін секвенирлеу нәтижесінде алынған аминқышқылдық тізбектер 18Б-суретте көрсетілген. Аминқышқылдық тізбектерінің айырмашылығына қарай фаг-дисплей әдісі арқылы іріктелген rRABV-G-XVIII-ге спецификалық VHH антиденелері екі топқа жіктеліп, VHH1 және VHH2 деп белгіленді.

Осы зерттеуде біз бір өркешті түйені rRABV-G-XVIII ақуызымен иммундадық, нәтижесінде VHH1 және VHH2 деп аталған екі бірдоменді антидене (VHH) бөлініп алынды. FR2 аймағындағы төрт консервативті аминқышқыл қалдықтары — Phe42, Glu49, Arg50 және Gly52 - бұрын сипатталған VHH-лардың ерекшеліктеріне сәйкес келеді [140].

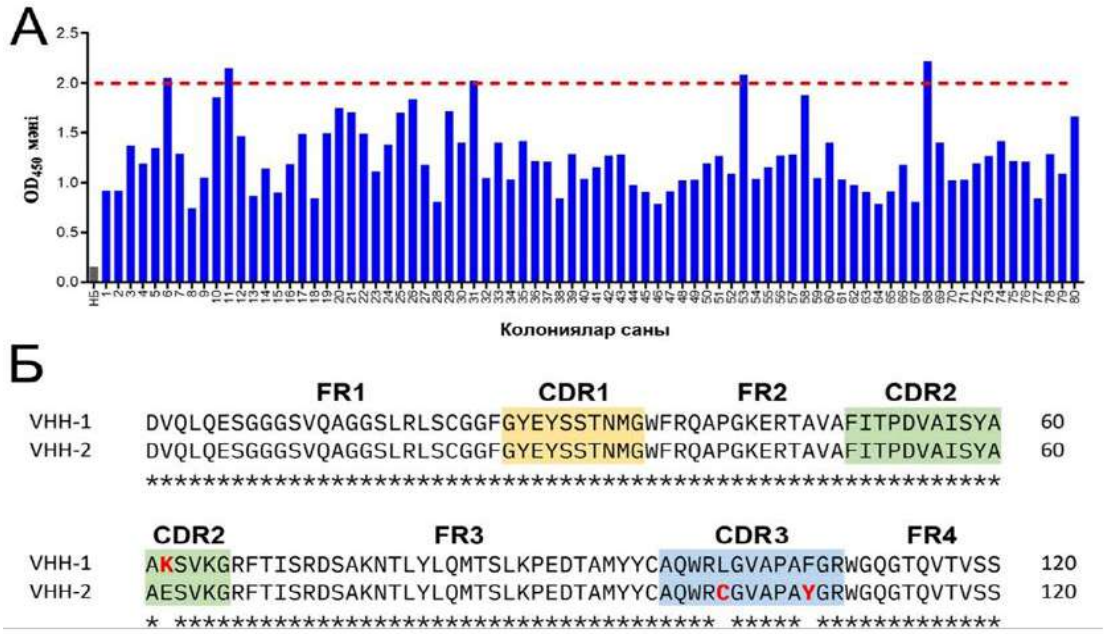
rRABV-G-XVIII-ге қарсы екі VHH құрамында иммуноглобулин қатпарына тән консервативті ішкі домендік дисульфидтік көпір бар (FR1-дегі цистеин 23 және FR3-дегі цистеин 104). VHH1 және VHH2 үшін CDR3 аймағы мен 50-позициядағы цистеин арасында екінші дисульфидтік көпір түзілуі ықтимал. Ал VHH1-де CDR3 аймағында цистеин болмады. Екінші дисульфидтік байланыстың болуы бір өркешті түйе VHH-ларында жиі кездесетін құбылыс [141].

VHH1 және VHH2 аминқышқылдық тізбектерін салыстыру олардың негізгі айырмашылықтары CDR2 және CDR3 аймақтарында орналасқанын көрсетті, ал каркастық аймақтары өзара жоғары ұқсастық танытты. Бұл екі нұсқаның да доменнің жалпы орналасуын сақтайтынын, ал антигенді байланыстырудағы айырмашылықтар негізінен CDR ілмектерінің химиялық қасиеттерімен анықталатынын көрсетеді.

CDR2 аймағындағы негізгі айырмашылық K → E аминқышқылдық алмасуы болып табылады. Бұл алмасу бүйір тізбектің зарядын оңнан теріске өзгертіп, CDR2 аймағының жергілікті электростатикалық қасиеттеріне ықпал етуі мүмкін. Осыған байланысты K немесе E нұсқасының басымдылығы антигеннің сәйкес учаскесіндегі аминқышқыл қалдықтарының заряды мен кеңістіктік орналасуына тәуелді болуы ықтимал. Демек, K → E алмасуы CDR2 аймағының конформациясына ғана емес, оның антигенмен электростатикалық өзара әрекеттесу сипатына да әсер етуі мүмкін.

Ең айқын айырмашылықтар CDR3 аймағында байқалды. CDR3 VHH молекуласының антигенді тануы мен байланысу ерекшеліктерін анықтайтын маңызды аймақтардың бірі болып саналады. VHH1 үшін CDR3 аймағында AQWRLGVAPA-FGRW, ал VHH2 үшін AQWRCGVAPA-YGRW аминқышқылдық мотивтері анықталды. VHH2-дегі L → C алмасуы CDR3 аймағының жергілікті химиялық қасиеттерін өзгертуі мүмкін. Лейцин гидрофобты аминқышқыл қалдығы болғандықтан, оның болуы гидрофобты өзара әрекеттесулерге ықпал етуі мүмкін, ал цистеиннің құрамындағы тиол тобы CDR3 аймағының химиялық қасиеттеріне әсер етеді. Cys қалдығы кеңістіктік тұрғыдан сәйкес келетін екінші цистеинмен жақын орналасқан жағдайда дисульфидтік байланыс түзіп, CDR3 ілмегінің тұрақтануына ықпал етуі мүмкін. Алайда мұндай байланыстың түзілуі тек аминқышқылдық тізбекке қарап нақты расталмайды және оның болуы кеңістіктік құрылымға тәуелді.

Фенилаланин негізінен гидрофобты және π-әрекеттесулерге қатысады, ал тирозин ароматты сақинаны сақтайды, бірақ қосымша гидроксил тобын қамтиды. Сондықтан Y нұсқасы антигенмен сутекті байланыстар түзе алады, бұл антиген бетінде қолайлы сутекті байланыс акцепторы немесе доноры болған жағдайда аффинділікті арттыруы мүмкін. Осы айырмашылықтарды ескере отырып, егер VHH-2-нің антигенді байланыстырушы учаскесі CDR3-тегі Cys және Tyr арқылы қосымша байланыстарды пайдаланса және егер CDR2-дегі K → E ауыстыруы антиген зарядына комплементарлы болса, VHH-2 жоғары аффинділікке ие болуы мүмкін деп болжауға болады. Алайда бұл болжам түпкілікті емес: VHH–антиген кешенінің құрылымы немесе ELISA, SPR/BLI немесе K_D өлшеуі сияқты эксперименттік деректерсіз қай нұсқа антигенді күштірек байланыстыратынын нақты айту мүмкін емес. Осылайша, антигенмен байланысатын ең ықтимал қалдықтар CDR3-те орналасқан: W, R, L/C, F/Y, сондай-ақ терминалды W. CDR2-де әлеуетті байланысушы учаске – бұл K/E ауыстыруы бар аймақ, өйткені ол VHH бетінің электростатикалық профилін өзгертеді.



А) rRABV-G-XVIII белгіленген және теріс бақылаудағы белокпен қапталған планшеттерде ИФА жүргізілді. Арнайы реакция Мус антиденесімен, хрен пероксидазасымен (HRP) байланысқан және TMB субстраты қолданылған кезде анықталды. Колониялар TG1 жасушаларымен жұқтырылған агар табақтарынан, үшінші паннинг раундын және элюция стратегияларын қолданғаннан кейін жиналды.

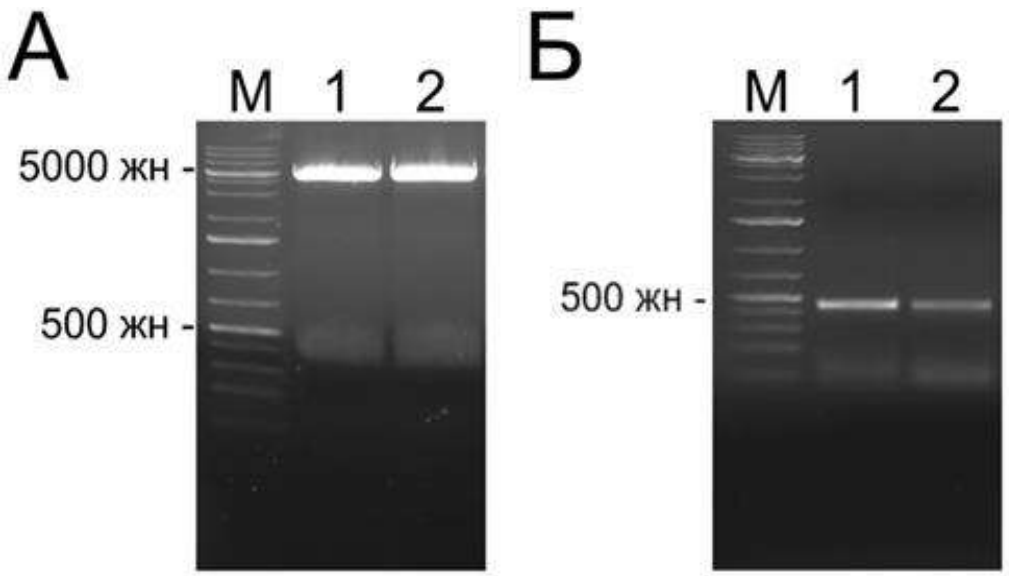
Б) PE-ELISA әдісі арқылы 80 клоннан 5 оң клон анықталды. Оптикалық тығыздық коэффициенті (OD) > 2 ең ерекше реакция ретінде бағаланды.

18- сурет - Анти-rRABV-G-XVIII VHH-спецификалық кітапхананы талдау

VHH1 және VHH2 арасындағы CDR2 және CDR3 аймақтарындағы аминқышқылдық алмастырулар олардың жалпы құрылымын сақтай отырып, заряд, полярлылық және ықтимал ароматты өзара әрекеттесулердің өзгеруі арқылы антигенмен байланысу қасиеттеріне ықпал етуі мүмкін.

3.2.2 RABV-G-XVIII-ге спецификалық наноантиденелердің экспрессиясы мен тазартылуы

VHH1 мен VHH2-нің кДНҚ-ларының функционалды экспрессиясын қамтамасыз ету үшін олар құрамында myc және His•Tag тізбектері бар pET28c(+) векторына NdeI және BamHI сайттары арқылы қайта клондалды. Нәтижесінде С-соңында myc және His•Tag тізбектері бар pET28c-vhh1-myc-His•Tag және pET28c-vhh2-myc-His•Tag рекомбинантты плазмидалары алынды. Кейіннен осы векторлар *E.coli* WK6 жасушаларына трансформацияланып, канамицинге төзімді жасуша культурасы 37 °С температурада OD_{600} = 0,6 мәніне дейін өсірілді. GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific. АҚШ) жиынтығының нұсқаулығы бойынша бөлініп алынған плазмидалық ДНҚ-ға құрамында vhh1 және vhh2 гендерінің бар болуын тексеру үшін рестрикциялық және ген-спецификалық праймерді пайлаланатын ПТР жасалынды. Тестілеудің нәтижелері 1% агарозды гельді электрофорез арқылы расталды (19-сурет)



А) pET28c-vhh1-myc-His•Tag (1-жолақ) және pET28c-vhh2-myc-His•Tag (2-жолақ) рекомбинантты плазмидаларының рестрикциялық талдауы; Б) pET28c-vhh1-myc-His•Tag (1-жолақ) және pET28c-vhh2-myc-His•Tag (2-жолақ) рекомбинантты плазмидаларының ПТР талдауы; М – ДНҚ маркері.

19-сурет – pET28c-vhh1-myc-His•Tag және pET28c-vhh2-myc-His•Tag плазмидаларымен трансформацияланған *E. coli* клондарының рекомбинантты плазмидалардың болуына талдауы

19А-суреттен көрініп тұрғандай, құрамында pET28c-vhh1-myc-His•Tag және pET28c-vhh2-myc-His•Tag плазмидалары бар клондарды NdeI және BamHI рестрикциялық эндонуклеазаларымен өңдеген кезде 1% агарозды гельде ұзындығы шамамен 5 кб және шамамен 500 ж.н. болатын айқын екі жолақ анықталды. Өлшемі бойынша бірінші жолақ кірістірмесіз pET28c плазмидасының ұзындығына сәйкес келсе, екінші жолақ vhh1 және vhh2 гендерінің ұзындығына сәйкес келді. Трансформанттардан бөлініп алынған плазмидалық ДНҚ-ны ген-спецификалық праймерлермен ПТР арқылы талдау нәтижесінде алынған ампликондардың өлшемі vhh1 және vhh2 гендері үшін күтілетін өлшемге сәйкес келді (19Б-сурет).

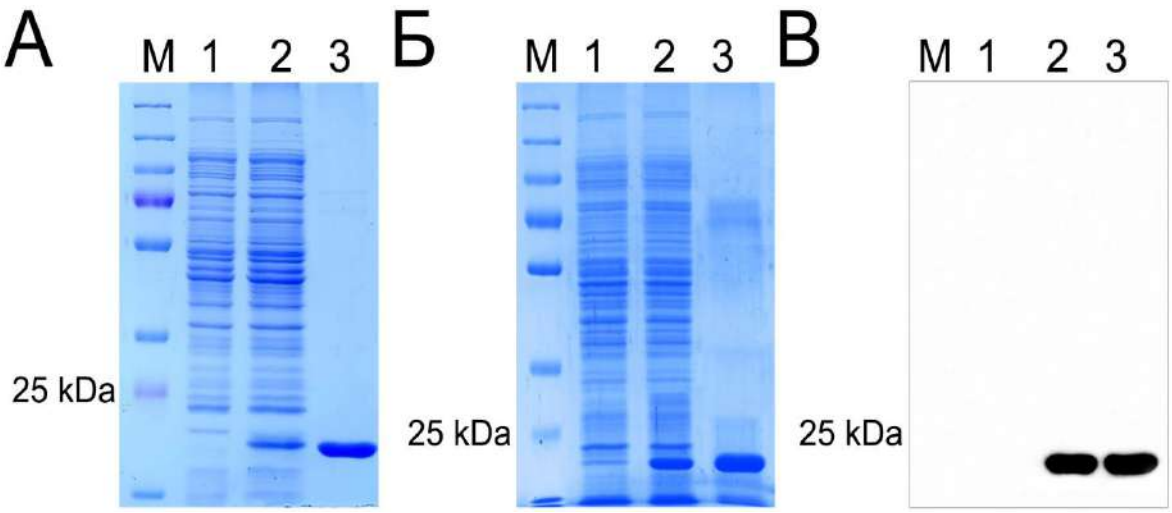
Скрининг нәтижесінде құрамында рекомбинантты плазмидалары бар 6 колония идентификацияланды. *E. coli* жасушаларындағы VHH1 және VHH2 гендері өнімдерін анықтау үшін T7 фагының РНҚ-полимеразасына негізделген экспрессиялық жүйе қолданылды. *E. coli* WK6 штаммының жасушаларына трансформацияланған VHH1 және VHH2 гендерінің экспрессиясы SDS-ПААГ электрофорезі көмегімен анықталды.

SDS-ПААГ электрофорезі нәтижелері бойынша рекомбинантты *E. coli* WK6 штаммының молекулалық массасы 15 кДа болатын ақуызды синтездейтіні анықталды, бұл VHH1 және VHH2 үшін болжанған молекулалық массаға сәйкес келді (20А және 20Б-сурет). Индуктор болмаған жағдайда сәйкес молекулалық массасы бар ақуыздың жинақталуы байқалмады, бұл осы гендердің тиімді экспрессияланғанын дәлелдейді.

Рекомбинантты ақуызды тазарту мақсатында ИПТГ қатысында көлемі 400 мл болатын трансформацияланған жасушалардың түнгі культурасы өсірілді. Жасушалар +4 °C температурада 6 000 × g салыстырмалы центрифугалық үдеуде 15 минут бойы центрифугалау арқылы жиналды. Кейін жасушалар құрамында протеаза ингибиторларының жиынтығы бар 20 мМ HEPES-KOH (pH 7,6) және 50 мМ KCl ерітіндісінде ресуспензияланды. Одан кейін жасушалар ультрадыбыстық өңдеу арқылы лизиске ұшыратылып, бактериалдық лизат жоғары жылдамдықтағы центрифугалау арқылы +4 °C температурада 40 000 × g жылдамдықта 30 минут бойы мөлдірлендірілді. VHH1 және VHH2 ақуыздарын тазарту көлемі 1 мл болатын HiTrap Chelating колонкасын пайдалана отырып, никель иондарына (Ni^{2+}) негізделген металлаффинді хроматография әдісі арқылы жүргізілді. Элюаттар ДСН қатысындағы электрофорез көмегімен талданды (20А және Б-сурет). Ұсынылған нәтижелерден рекомбинантты VHH1 және VHH2 ақуыздарының гомогенді күйге дейін тазартылғаны көрінеді. RABV-G-XVIII-ге қарсы VHH шығымы культураның әр литрінен 9,2–20,5 мг аралығында болды. Сонымен қатар, аталған ақуыздардың Мус-эпитопқа қарсы моноклоналды антиденелермен байланысуы олардың құрамында Мус-эпитоптың болуын растады (20-сурет, С; 2-жолақ – VHH1, 3-жолақ – VHH2).

Осылайша, алынған нәтижелер рекомбинантты VHH1 және VHH2 ақуыздарының экспрессиясы мен жоғары тазалық дәрежесінде бөлініп алынғанын растады. Алынған ақуыздардың функционалдық тұрғыдан

белсенділігін әрі қарай зерттеу үшін олар келесі эксперименттерде пайдаланылды.



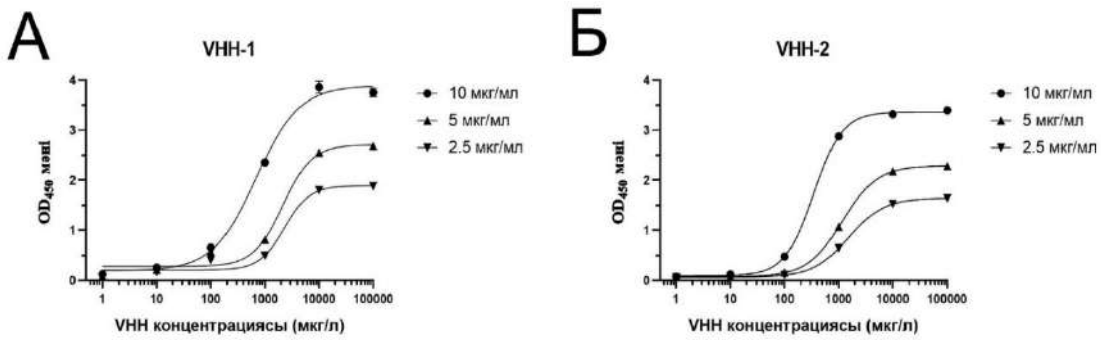
Ескертпе: VHH1 (А) және VHH2 (Б) наноантиденелері *E. coli* жасушаларында экспрессияланды және иммобилизацияланған металл аффинді хроматография (IMAC) әдісімен тазартылды. М-жолақ – молекулалық масса маркерлері; 1-жолақ – IPTG индукциясына дейінгі *E. coli* WK6 трансформацияланған жасушаларының жалпы ақуызы (pET28a-vhh-myc-His•Tag); 2-жолақ – IPTG арқылы индукцияланған *E. coli* WK6 pET28a-vhh-myc-His•Tag трансформанттарының жалпы жасушалық ақуызы, мұнда ~25 кДа аймағында анти-rRABV-G-XVIII-ге қарсы VHH жолақтары байқалады; 3-жолақ – металл-хелатты аффинді хроматография арқылы тазартылған VHH1 және VHH2 ақуыздары. (С) Рекомбинантты VHH1 және VHH2 ақуыздарының вестерн-блот талдауы. 1 – теріс бақылау; 2 – VHH1; 3 – VHH2.

20-сурет- rRABV-G-XVIII-ге қарсы спецификалық наноантиденелердің экспрессиясы және тазартылуы.

rRABV-G-XVIII ақуызына қарсы алынған VHH наноденелерінің аффинділік қасиеттері ИФТ әдісі арқылы зерттелді. Аффинділік константаларын анықтау үшін планшетке үш түрлі концентрацияда (10, 5 және 2,5 мкг/мл) rRABV-G-XVIII ақуызы иммобилизацияланды және VHH наноденелерінің сериялық сұйылтулары қолданылды. Әрбір антиген концентрациясы үшін максималды оптикалық тығыздық мәнінің 50%-ына сәйкес келетін антидене концентрациясы [Ab]t ретінде анықталды. Алынған деректер негізінде Beatty әдісі бойынша аффинділік константасының (Kaff) үш есептік мәні анықталып, олардың орташа арифметикалық мәні көрінерлік аффинділік константасы ретінде қабылданды. VHH наноденелерінің аффинділік графиктері 21-суретте көрсетілген.

ИФТ нәтижелері VHH1 және VHH2 наноденелерінің де барлық зерттелген антиген концентрацияларында rRABV-G-XVIII ақуызымен айқын дозаға тәуелді

түрде байланысатынын көрсетті. Алынған сигмоидты байланысу қисықтары наноденелердің иммобилизацияланған антигенмен жоғары дәрежеде спецификалық өзара әрекеттесетінін растады (21-сурет). Байланысу қисықтарының сипаты екі нанодененің де мақсатты антигенге жоғары аффинділік танытатынын көрсетті. Beatty әдісі бойынша жүргізілген есептеулер VHH1 және VHH2 наноденелерінің аффинділік көрсеткіштерін сандық тұрғыдан бағалауға мүмкіндік берді және олардың құтыру вирусының гликопротеинін тиімді тануға қабілетті екенін дәлелдеді.



В

	VHH1	VHH2
[Ab]t at 10 µg/L	548.44 ng/mL	305.68 ng/mL
[Ab']t at 5 µg/L	1838.45 ng/mL	1004.25 ng/mL
[Ab'']t at 2.5 µg/L	2021.05 ng/mL	1357.08 ng/mL
K1=1/(2(2[Ab']t-[Ab]t))	$2{,}84 \times 10^6\ M^{-1}$	$5{,}22 \times 10^6\ M^{-1}$
K2=1/(2(2[Ab'']t-[Ab']t))	$4{,}04 \times 10^6\ M^{-1}$	$5{,}20 \times 10^6\ M^{-1}$
K3=3/(2(4[Ab'']t-[Ab]t))	$3{,}54 \times 10^6\ M^{-1}$	$5{,}30 \times 10^6\ M^{-1}$
Kaff=(K1+K2+K3)/3	$3{,}47 \times 10^6\ M^{-1}$	$5{,}25 \times 10^6\ M^{-1}$

А және Б – антигеннің әртүрлі концентрацияларындағы доза–жауап қисықтары; В – аффинділік константаларын есептеу нәтижелері

21- сурет -rRABV-G-XVIII ақуызына қарсы VHH наноденелерінің аффинділік константаларын ИФА әдісімен анықтау.

Сәйкес антиген концентрацияларының жұптары (10 және 5 мкг/мл; 10 және 2,5 мкг/мл; 5 және 2,5 мкг/мл) қолданылып қайта есептеу жүргізілгеннен кейін келесі жуық аффинділік константалары алынды: VHH1 үшін Kaff ≈ $3{,}5 \times 10^6\ M^{-1}$, ал VHH2 үшін Kaff ≈ $5{,}2 \times 10^6\ M^{-1}$. Бұл түзетілген мәндер бастапқыда хабарланған нәтижелерден ерекшеленеді және Beatty формуласының неғұрлым дәйекті түрде қолданылғанын көрсетеді. VHH2 үшін қайта есептелген K мәндері барлық концентрациялар жұптары бойынша салыстырмалы түрде біркелкі болды, ал VHH1 айтарлықтай вариабельділік көрсетті, бұл оның байланысуының тұрақтылығы төменірек екенін немесе талдау шарттарына сезімталдығы жоғары екенін болжайды. VHH2 VHH1-мен салыстырғанда әрдайым жоғары жуық аффинділікті көрсетті, айырмашылық шамамен 1,5 есені құрады. Бұл сондай-ақ доза–жауап қисықтарының солға ығысуынан да байқалады, ол салыстырмалы байланысу деңгейлеріне жету үшін VHH2-нің төменірек концентрациялары

жеткілікті екенін көрсетеді. Мұндай мінез-құлық әдетте антигенмен неғұрлым күшті немесе қолайлы өзара әрекеттесумен байланысты. Құрылымдық тұрғыдан алғанда, бұл айырмашылықтарды CDR аймақтарындағы аминқышқылдар тізбегінің вариацияларымен түсіндіруге болады. VHH2-дегі CDR2 (K→E) және CDR3 (L→C және F→Y) орынбасулары электростатикалық өзара әрекеттесулердің өзгеруі және сутектік байланыстар түзу қабілетінің артуы есебінен байланысу аффинділігін күшейтуі мүмкін.

Фенилаланиннің тирозинге (F→Y) орынбасуы CDR3 аймағына полярлы гидроксил тобын енгізіп, антигенмен қосымша сутектік байланыстар немесе басқа да қолайлы өзара әрекеттесулер түзуге ықпал етуі мүмкін. Ал лейциннің цистеинге (L→C) орынбасуы CDR3 ілмегінің жергілікті конформациясы мен химиялық қасиеттеріне әсер етуі ықтимал. Бұл құрылымдық болжамдарды тікелей эксперименттік деректермен растау қажет.

Алынған Kaff мәндері ИФА нәтижелері бойынша Beatty әдісімен есептелген көрінерлік аффинділік константалары болып табылады. Бұл әдіс антиген–антидене әрекеттесуінің диссоциация константасын (KD) тікелей анықтамайды. Есептелген мәндерге антигеннің планшет бетіне иммобилизациялануы, оның тығыздығы мен кеңістіктік орналасуы сияқты факторлар әсер етуі мүмкін. Сондықтан алынған Kaff мәндері абсолютті аффинділікті емес, зерттеу жағдайында VHH1 және VHH2 наноантиденелерінің антигенмен байланысу қабілетін салыстырмалы бағалау үшін қолданылды.

Осылайша, екі наноантидене де rRABV-G-XVIII антигенімен байланысу қабілетін көрсетті, ал зерттелген жағдайларда VHH2 көрінерлік аффиніліктің жоғарырақ мәнімен сипатталды. VHH1 және VHH2 арасындағы байқалған айырмашылық салыстырмалы түрде аз болғанымен, ол CDR аймақтарындағы аминқышқылдық вариациялардың антигенмен байланысу қасиеттеріне ықтимал әсерін көрсетеді. Осы нәтижелерді ескере отырып, кейінгі функционалдық зерттеулерді жүргізу үшін VHH2 наноантиденесі таңдалды.

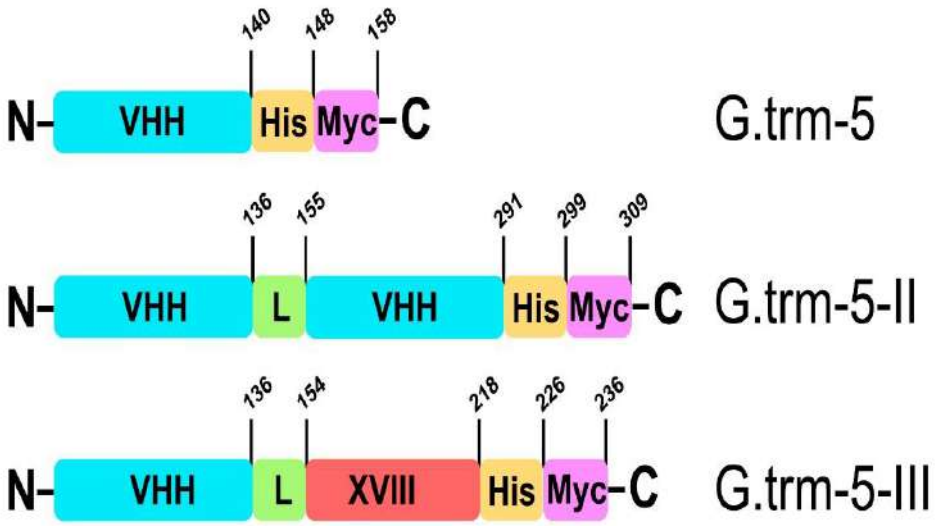
3.3 RABV-ке спецификалық димерлі және тримерлі наноденелерді алу

3.3.1 Димерлі және тримерлі наноденелерді кодтайтын гендердің экспрессиясы үшін рекомбинантты ДНҚ құрылымын жасау

Кейбір жағдайларда вирусқа қарсы тиімділікті арттыру мақсатында бірдей немесе әртүрлі эпитоптарды танитын екі не одан да көп наноантидене мономерлерін тандемді байланыстыру арқылы биспецификалық, мультиспецификалық немесе мультивалентті наноантиденелер құрастырылуы мүмкін [110]. Мұндай арнайы форматтау үдерісі құрастырылған поливалентті антигенбайланыстырушы молекулалардың антигенмен байланысу авидтілігін арттырып, функционалдық белсенділігін күшейтуі мүмкін. Димерлі наноантиденелер бұрын сипатталған стратегияны пайдалану арқылы құрастырылды, мұнда бірінші наноантиденеңің құрамында BglI рестрикция сайттары, ал екінші наноантиденеңің 5′- және 3′-ұштарында сәйкесінше BamHI және XbaI рестрикция сайттары болды. Бұл ретте екі наноантиденеңің арасында «GGGGSGGGGSGGGGS» линкері орналасты (22-сурет). Осы мақсатта біз

rRABV-G-XVIII ақуызына спецификалық наноантиденені (VHH2) кодтайтын ген pADL23c-VHH2 плазмидасынан Dir_VHH_NcoI және Rev_VHH_XhoI праймерлер жұбын пайдалана отырып амплификацияладық (6-кесте) және NcoI және XhoI рестрикциялау сайттары бойынша pET-28c(+) векторына енгіздік. Бұл векторда VHH2 наноантидесін кодтайтын тізбектен кейін 6×His және Myc-тегтер орналасқан. Myc-тег рекомбинантты ақуызды c-Myc-ке қарсы антиденелердің көмегімен оңай анықтауға мүмкіндік береді, бұл ИФА және Вестерн-блот әдістері үшін пайдалы. 6×His-тег никель-аффиндік хроматография арқылы ақуыздарды тазартуды жеңілдетеді және анти-His антиденелерін пайдаланып анықтауға да болады.

Еквивалентті наноантидене конструкциясын алу үшін бірінші VHH2 наноантиденесінің С-соңына «GGGGSGGGGSGGGGS» линкері жалғанып, одан кейін екінші VHH2 наноантиденесінің гені біріктірілді. Екінші VHH2 гені Dir_VHH_BamHI және Rev_VHH_XbaI праймерлерінің көмегімен амплификацияланып, *BamHI–XbaI* рестрикциялау сайттары арқылы бірінші VHH2 генінің 3′-соңына клондалды (22-сурет).



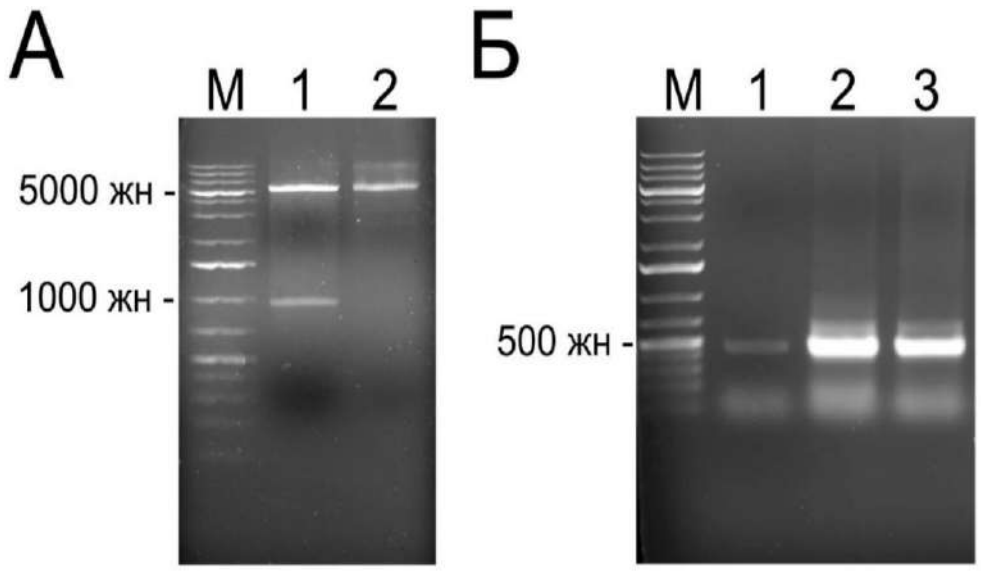
VHH2 наноденесі, L = Gly-Gly-Ser-Gly-Gly линкері, XVIII = адамның XVIII типті колагенінің домені, His = 6×His-тегі, Myc = Myc-тегі

22-сурет – G.trm-5 наноденелерінің рекомбинантты конструкциялары [126]

Келесі эксперименттерде жоғарыда аталған гендердің экспрессиясы үшін pET28c(+) векторы таңдалды. Бұл вектор ген экспрессиясына қажетті келесі сипаттамаларға ие: бактериофаг Т7-нің күшті, *lac*-индуцирленетін промоторы, кірістірілетін ДНҚ үшін қолайлы сыйымдылығы және селекция жүргізудің қарапайымдылығы [48]. Димерлі наноантиденелерді кодтайтын генді алу үшін XbaI және BamHI рестрикциялық сайттарымен шектелген ДНҚ фрагменттері дәл сол рестриктазалармен өңделген pET28c(+) плазмидасына клондалып, нәтижесінде pET28c/VHH_VHH рекомбинантты плазмидасы құрастырылды.

Векторлық ДНҚ мен *vhh2-L-vhh2* генінің кДНҚ-сының рестриктазалармен гидролиз өнімдері Т4 лигазаның көмегімен лигирленді. Рекомбинантты векторлар рекомбинантты плазмиданы алу мақсатында *E. coli* DH5α штамына трансформацияланды. Клондарды селекциялау LB агарланған қоректік ортасында канамицинмен (70 мкг/мл) жүргізілді. GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific #K0503) жинағының протоколына сәйкес бөлініп алынған плазмидалық ДНҚ құрамында *vhh2-L-vhh2* гені бар рекомбинантты плазмидалардың болуын тексеру үшін рестрикциялық талдау және ген–спецификалық праймерлерді қолдана отырып ПТР талдау жүргізілді. Талдау нәтижелері 1% агарозды гельдегі электрофорез әдісімен бағаланды (23-сурет).

Плазмиданың рестрикциялық талдау нәтижелері 23-суретте көрсетілген. Суреттен көрініп тұрғандай, pET28C/vhh_vhh плазмидаларын қамтитын клондар XbaI және BamHI рестрикциялық эндонуклеазаларымен өңделген кезде 1% агарозды гельде – 989 ж.н. және 5225 ж.н. болатын екі айқын жолақ береді. Өлшемдеріне сәйкес бірінші жолақ - pET28c(+) плазмиданың ұзындығына, ал екінші жолақ — *vhh2-L-vhh2* генінің ұзындығына сәйкес келеді.



А) pET28c/VHH-L-VHH плазмидасының рестрикциясы. 1 – рестрикциядан кейінгі плазмида; 2 – өңделмеген плазмида.
Б) VHH-L-VHH генінің ПТР өнімдері. 1–3 – трансформацияланған колониялар. M – GeneRuler 1 kb Plus ДНҚ маркері.

23-сурет – VHH-L-VHH генінің рестрикция және ПТР өнімдерінің агарозды гель-электрофорезі

Келесі кезеңде наноантиденелердің гомотримерленген нұсқасы құрастырылды. Бұл стратегия құтыру вирусының G-гликопротеинімен байланысу жағдайында анағұрлым тиімді тәсіл болуы мүмкін, себебі құтыру вирусының G-гликопротеині тримерлі құрылым түзетіні көрсетілген [198]. Алайда наноантиденелерді біріктіру үшін ерекше қасиеттерге ие

тримеризациялық домен қажет: біріншіден, пациенттерде қолдану мақсатында оның иммуногенділігі барынша төмен болуы тиіс, яғни ол кең таралған адам ақуызынан алынуы қажет. Екіншіден, бактерияларда көп мөлшерде өндіру мүмкіндігін қамтамасыз ету үшін оның көлемі шағын болуы керек, сонымен қатар алынған біріктірілген наноантиденелер, олардың қан ағымынан жылдам шығарылуын болдырмайтын шекті мөлшерден аспауы тиіс. Үшіншіден, оның құрамында N-гликозилдену сайттары болмауы қажет, себебі олар *E. coli* жүйесінде пайдаланылмайды. Осыған байланысты бұл жобада жоғарыда аталған талаптарға толық сәйкес келетін адамның XVIII типті коллагенінің тримерлену домені (PDB тіркеу нөмірі 3HSH) қолданылды [138].

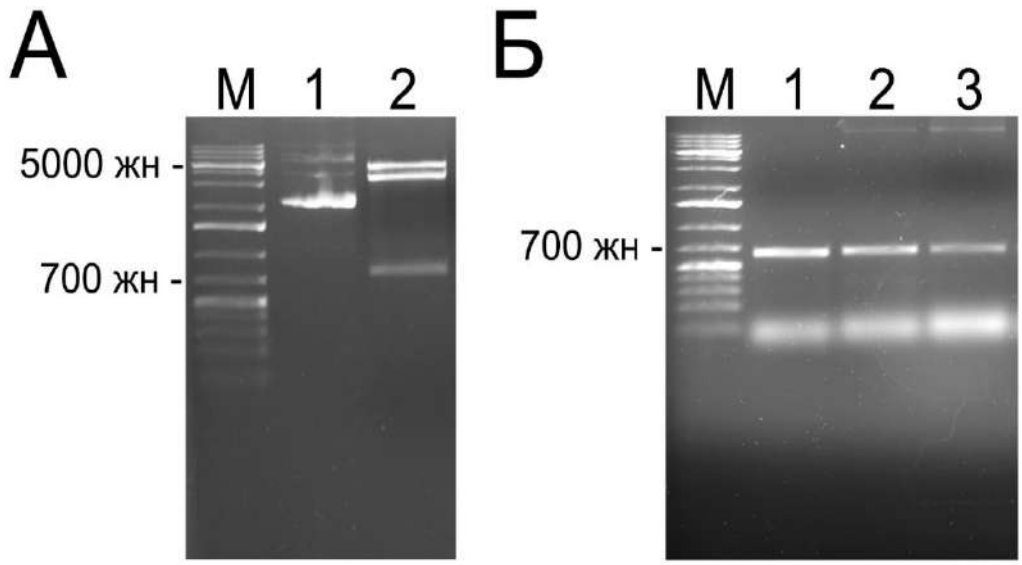
XVIII типті коллаген мультиплексинді коллагендер тұқымдасының белгілі жалғыз мүшесі болып табылады. Бұл домен адам ағзасында кездесетін ақуыздан алынғандықтан, оның адам иммундық жүйесіне қатысты иммуногенділігі төмен деп қарастырылады. Сонымен қатар, таңдалған доменде N-гликозилдену сайттарының болмауы оның *E. coli* жүйесінде экспрессиялануына қолайлы жағдай жасайды.

Тримерлі конструкция VHH2 наноантиденесінің тізбегін адамның XVIII типті коллагенінің тримеризациялық доменімен біріктіру арқылы құрастырылды. Конструкцияның С-соңында c-Myc эпитопы мен His-тегі орналастырылды (23-сурет). Тримерлі наноантидене конструкциясын алу үшін VHH2 наноантиденесінің геніне «GGGGSGGGGSGGGGS» линкері жалғанып, оның 3′-соңына NcoI және EcoRI рестрикция сайттары енгізілді. Адамның XVIII типті коллагенінің тримеризациялық доменін кодтайтын ДНҚ фрагменті Dir_VHH_NcoI және Rev_VHH_EcoRI праймерлерінің көмегімен амплификацияланып, NcoI және EcoRI рестрикция сайттары арқылы клондалды. Нәтижесінде рекомбинантты pET28c-PelB-cVHH2-L-XVIII_his-c-myc плазмидасы құрастырылды.

Рекомбинантты конструкцияларды көбейту мақсатында алынған плазмидалар *E. coli* DH5α жасушаларына трансформацияланды. Антибиотикке төзімді трансформанттарды сұрыптау үшін құрамында 70 мкг/мл канамицин бар LB агарлы қоректік орта пайдаланылды. Трансформацияланған жасушалардан оң колониялардың плазмидалық ДНҚ-сы GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, #K0503) жиынтығының нұсқаулығына сәйкес бөлініп алынды. Құрамында *vhh2-l-xviii* гені бар рекомбинантты конструкцияларды анықтау мақсатында рестрикциялық және ген-спецификалық праймерлерді пайдалана отырып ПТР талдауы жүргізілді. Алынған өнімдер 1% агарозды гельдегі электрофорез әдісі арқылы талданып, нәтижелері 24-суретте көрсетілді.

Рекомбинантты конструкцияның дұрыстығын қосымша растау мақсатында конструкцияны белгілі рестрикция учаскелерінде кесетін ApaI рестрикциялық эндонуклеазасы қолданылды. VHH2-L-XVIII конструкциясы дұрыс клондалған жағдайда ұзындығы шамамен 800 ж.н. болатын ДНҚ фрагментінің түзілуі күтілді (24-сурет).

Скрининг нәтижесінде рекомбинантты плазмидаларды қамтитын 5 колония идентификацияланды. Клондар екі бағытта секвенирленді.



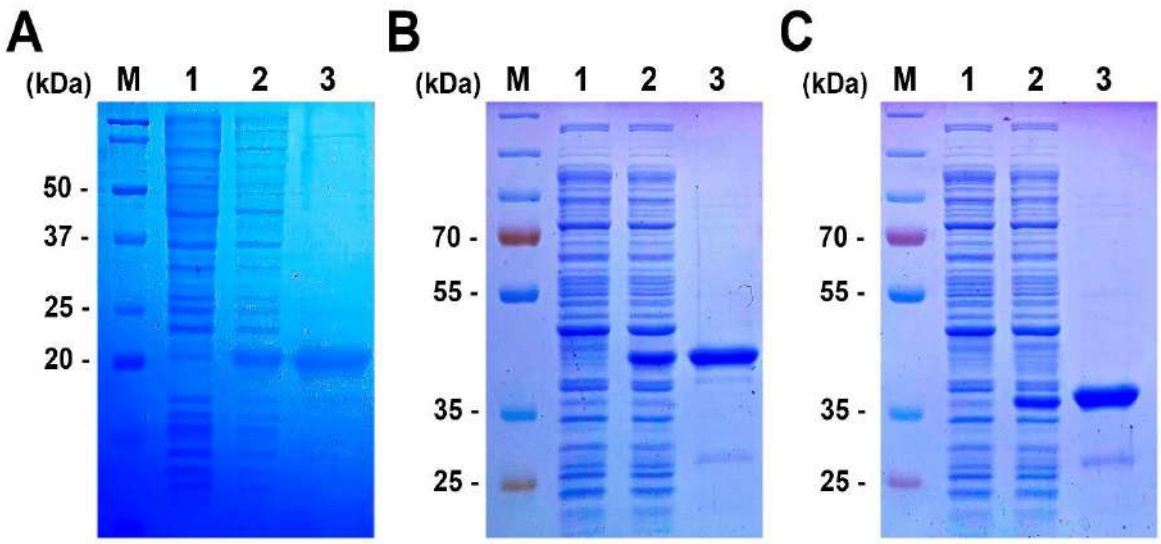
А) pET28c/VHH-L-XVIII плазмидасының рестрикциясы. 1 – өңделмеген плазмида; 2 – рестрикциядан кейінгі плазмида. Б) vhh-l-xviii генінің ПТР өнімдері. 1–3 –трансформацияланған колониялар. М – GeneRuler 1 kb Plus ДНҚ маркері. Вектор – 5265 ж.п. / Тример – 800 ж.п.

24-сурет – vhh-l-xviii генінің рестрикция және ПТР өнімдерінің агарозды гель-электрофорезі

Рестрикциялық талдау нәтижесінде алынған фрагменттердің мөлшері күтілген өлшемдерге сәйкес келді, бұл vhh-l-xviii генетикалық конструкциясының плазмида құрамына дұрыс енгізілгенін растады. ПТР нәтижелері vhh1 және vhh2 гендерінің нуклеотидтік тізбектерімен толық сәйкестікті көрсетті.

3.3.2 Димерлі және тримерлі формадағы рекомбинантты наноденелердің *E. coli* жасушаларында экспрессиялануы

С-соңында 6×His-тегі бар үш рекомбинантты наноантиденелердің—мономерлік (VHH2), димерлік (VHH2-L-VHH2) және тримерлік (VHH2-L-XVIII) нұсқалары *E. coli* жасушаларында экспрессияланып, никель-аффинді хроматография арқылы тазартылды. Алынған ақуыз препараттарының тазалығы 95% деңгейінде болды, бұл ДСН-ПААГ нәтижелерімен расталды (25А, В және С-суреттер). Мономерлі, димерлі және тримерлі наноантиденеледің электрофоретикалық миграциясы олардың есептелген молекулалық массаларына сәйкес бірегей жолақтар түрінде байқалды (тиісінше 18 кДа, 38 кДа және 26 кДа). Барлық үш конструкция үшін айқын қосымша жолақтардың болмауы рекомбинантты ақуыздардың жоғары тазалық дәрежесін және протеолитикалық ыдыраудың елеулі деңгейде жүрмегенін көрсетті. Алынған нәтижелер мономерлік, димерлік және тримерлік наноантиденелердің құрылымдық тұтастығын растап, олардың кейінгі функционалдық зерттеулерде қолдануға жарамды екенін дәлелдеді.



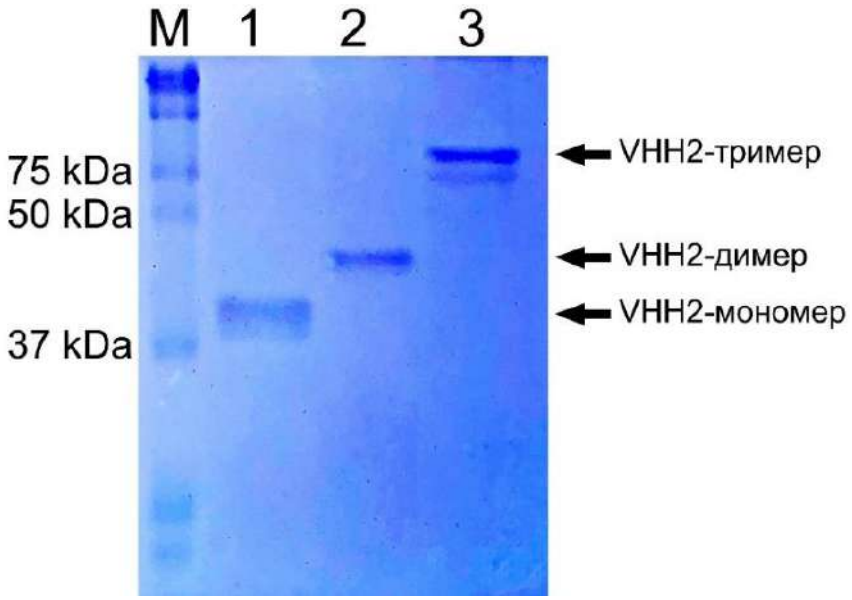
VHH-спецификалық наноденелерінің ақуыздары денатурация жағдайында 15% ДСН-ПААГ-та (мономер (А)) және 10% ДСН-ПААГ-та (димер (В) және тример (С)) бөлінді. ДСН-ПААГ гельдері Кумасси ерітіндісімен боялып, түссіздендіру ерітіндісінде шайылды. М: Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ және PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10–250 кДа; 1 – E. coli-ден алынған индуцирленбеген жасушалық экстракт; 2 – E. coli-ден алынған индуцирленген жасушалық экстракт; 3 – тазарған белок.

25-сурет – VHH ақуыздарының экспрессиясы мен тазартылуы

Рекомбинантты VHH наноантиденесінің олигомерлік күйін бағалау мақсатында адам коллагенінің XVIII типті тримеризациялық доменімен біріктірілген VHH наноантиденесі нативті ПААГ электрофорезі әдісімен талданды. Ақуыз кешендерінің денатурацияланбаған конформациясын сақтау мақсатында құрамында SDS жоқ 10%-дық нативті полиакриламидті гель қолданылды. Талдау үшін диализден кейін алынған фракциялардан 10 мкг тазартылған рекомбинантты ақуыз пайдаланылды. Диализ 100 мМ NaCl және 50 мМ натрий фосфаты бар буфер құрамындағы тұздарды ішінара жою мақсатында жүргізілді, өйткені тұздардың жоғары концентрациясы нативті электрофорез кезінде ақуыздардың миграциясына және тұрақтылығына әсер етуі мүмкін.

Нативті ПААГ электрофорезінің нәтижелері (26-сурет) рекомбинантты VHH наноантиденесінің бірнеше олигомерлік формаларының бар екенін көрсетті. Гельде шамамен 28, 48 және 84 кДа аймақтарында сәйкесінше мономерлі, димерлі және тримерлі формаларға тән белдеулер анықталды. Шамамен 84 кДа аймағындағы белдеудің басым болуы рекомбинантты VHH наноантиденесінің тримерлі күйде басым орналасқанын көрсетті. Бұл нәтиже адам коллагенінің XVIII типті тримеризациялық доменінің VHH конструкциясын тұрақты олигомерлік формаға біріктіру қабілетін растайды

және алынған тримерлі конструкцияның есептік молекулалық массасымен сәйкес келеді.



26-сурет - VHH тримерлік нанотеласының нативті жағдайдағы электрофоретикалық талдауы (Native PAGE).

Мономерлік, димерлік және тримерлік формаларды қамтитын үлгі; алынған белдеу үлгісі тримерлік наноантидененің нативті жағдайда сәтті тримерленгенін растайды.

3.4 RABV-ке спецификалық моно-, димерлі және тримерлі наноденелердің сипаттамасы және олардың in vivo жағдайындағы RABV-ті бейтараптандыру тиімділігін зерттеу

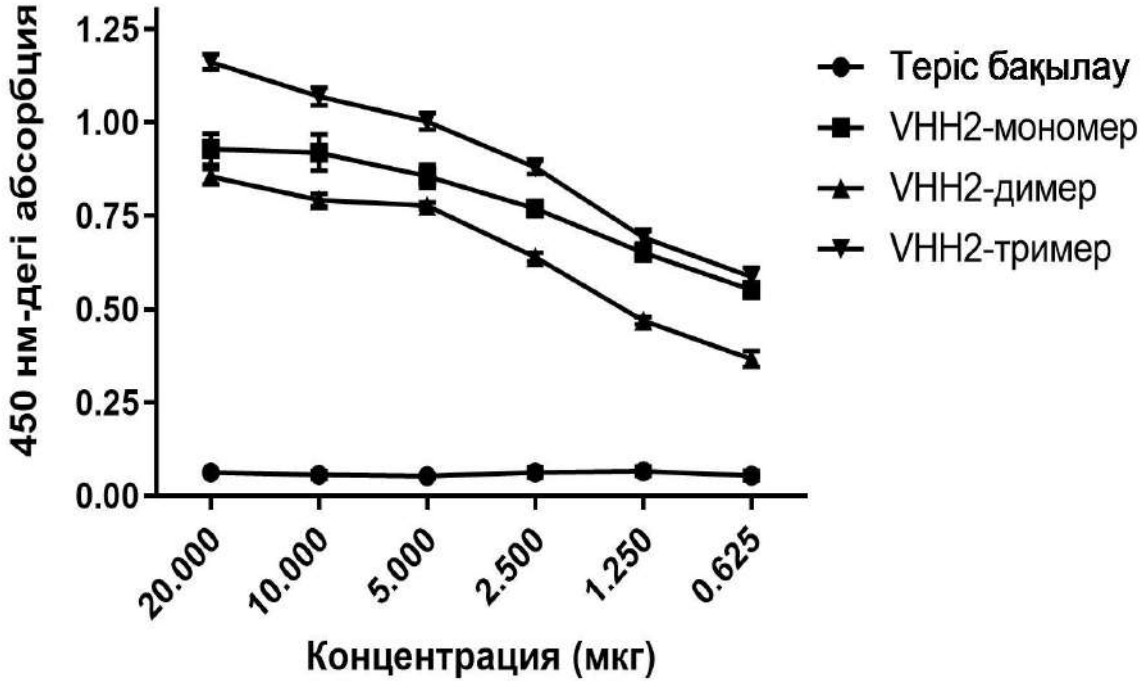
3.4.1 Наноантиденелер титрін ИФТ әдісімен анықтау

Антигенге тән байланысу қасиеттері VHH2, VHH2-L-VHH2 және VHH2-L-XVIII наноантиденелері үшін иммобилизацияланған толық инактивтелген құтыру вирусына (RABV) қарсы жанама иммуноферменттік талдау (жанама ИФА) арқылы анықталды. Иммобилизацияланған антигенмен наноденелердің байланысу деңгейі желек-пероксидазасымен (HRP) конъюгирленген тышқанға қарсы Мус-спецификалық иммуноглобулин G пайдалану арқылы бағаланды.

27-суретте мономерлі, димерлі және тримерлі VHH наноантиденелерінің толық инактивтелген RABV антигенімен 0,625 мг/мл концентрациясында байланысу ерекшеліктері көрсетілген. Барлық тәжірибелік топтарда иммобилизацияланған рекомбинантты гликопротеиннің мөлшері бірдей болып, әр ұяшыққа 1 мкг антиген енгізілді. Теріс бақылау ретінде PBS қолданылды. Оптикалық тығыздық 450 нм толқын ұзындығында өлшенді.

Жанама ИФА нәтижелеріне сүйене отырып, тримерлік наноантидененің ең жоғары байланысу көсеткішін көрсеткені анықталды, ал димерлік форма төменгі спецификалық қасиетке ие болды. Күтілгендей, тримерлендіруші домен

наноантидененің құтыру вирусының гликопротеинінің тримерлі формасына аффиндігін арттырды. Керісінше, димер мономерлік наноантиденемен салыстырғанда төмен нәтиже көрсетті, бұл, ықтимал, оның G-ақуызының антигендік детерминанттарымен байланысуға қолайсыз конформацияға ие болуымен түсіндіріледі.



Теріс бақылау – PBS; наноденелер титрі ақуыздың максималды сұйылту деңгейі ретінде анықталады, онда A450 (A450 VHH2/A450 PBS) қатынасы 2:1-ден жоғары болады. Деректер орташа мән ± стандартты ауытқу (SD) ретінде көрсетілген

27- сурет RABV-ге спецификалық наноденелерін талдау

Олай болса, жанама ИФТ нәтижелеріне сәйкес, тримерлік наноантидене жоғары спецификалық байланысу қабілетін көрсетті, ал димерлік формада бұл көрсеткіш төмен болды. Осылайша, тримерлендіру домені құтыру вирусының гликопротеинінің тримерлі формасына наноантителаның байланысу тиімділігін арттыратыны біздің күткенімізбен сәйкес келеді. Димерлі наноантидененің мономерлі VHH2-ге қарағанда төмен байланысу сигналын көрсетуі оның кеңістіктік конформациясының антигендегі байланысу учаскелеріне қолжетімділікті төмендетуімен немесе VHH домендерінің өзара орналасуының антигенмен тиімді байланысуға қолайсыз болуымен түсіндірілуі мүмкін. Алайда бұл болжамдарды нақты растау үшін қосымша құрылымдық және биофизикалық зерттеулер жүргізу қажет.

Тримерлік наноантидененің жоғары байланысу белсенділігі оның құрамындағы XVIII типті коллагеннің тримерлендіруші доменінің әсерімен түсіндірілуі мүмкін. Бұл домен наноантидене молекулаларының кеңістіктік ұйымдасуын тұрақтандырып, олардың құтыру вирусының табиғи тримерлі гликопротеинімен көпвалентті өзара әрекеттесуіне мүмкіндік беруі ықтимал. Нәтижесінде антигенмен байланысудың жалпы беріктігі артып, авидтілік әсерінің күшеюі тримерлік наноантидененің жоғары байланысу көрсеткішіне ықпал етуі мүмкін.

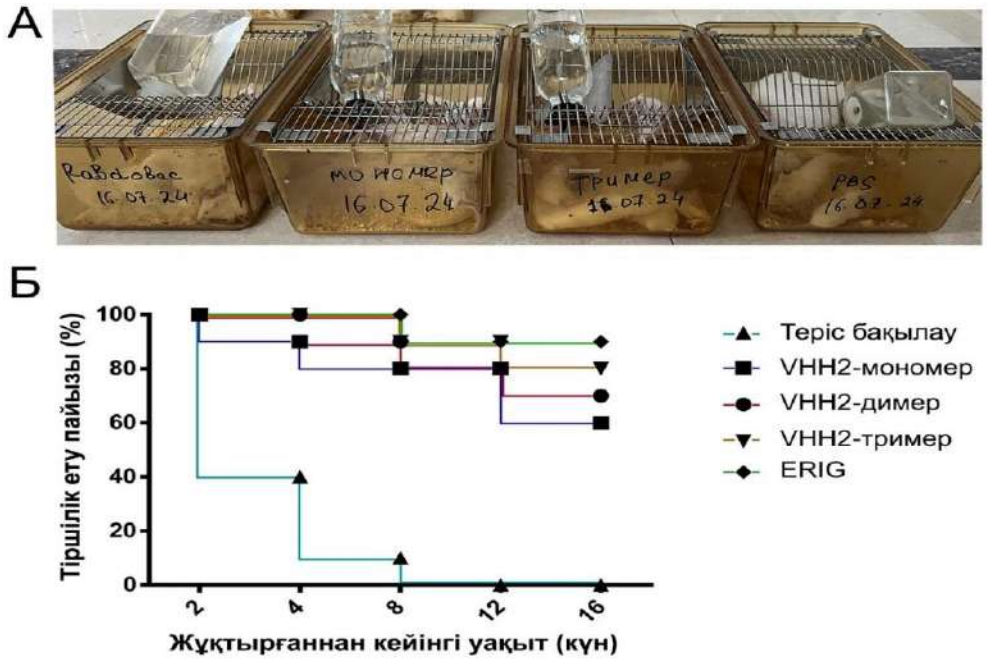
Тримерлік конструкцияның жоғары байланысу белсенділігі оның диагностикалық жүйелерде және құтыру вирусын бейтараптандыруға бағытталған зерттеулерде перспективалы молекула ретінде қолданылу мүмкіндігін көрсетеді. Димерлік нұсқада байқалған төмен байланысу көрсеткіші оның кеңістіктік конфигурациясы антигеннің эпитоптарымен тиімді өзара әрекеттесуге қолайсыз болуы мүмкін екенін көрсетеді. Алынған нәтижелер наноантиденелердің функционалдық қасиеттеріне олардың олигомерлену дәрежесі мен кеңістіктік ұйымдасуы елеулі әсер етуі мүмкін екенін көрсетеді.

3.4.2 Ақ тышқандарда *in vivo* жағдайында наноденелердің бейтараптандыру қабілетін анықтау.

Вирусты бейтараптандыру сынағы арнайы зертханалық жағдайларда жүргізілді. Тәжірибе барысында тышқандарға құтыру вирусының (RABV) өлімге әкелетін дозасы мономерлі, димерлі немесе тримерлі наноантиденелердің әрқайсысымен бір мезгілде енгізіліп, олардың қорғаныш тиімділігі бағаланды (28-сурет). ERIG бейтараптандыру сынағының оң бақылауы ретінде қолданылды. Тек CVS-11 вирусы енгізілген теріс бақылау тобында өлім-жітім 100% құрады. Мономерлі және димерлі наноантиденелер 300 мкг мөлшерінде енгізілген топтарда жануарлардың өмір сүру деңгейі 80% құрады, ал дәл осы мөлшерде тримерлі наноантидене енгізілген топта өмір сүру деңгейі 100%-ға жетті (28Б-сурет). Вакцина және ERIG (15,4 ХБ) енгізілген оң бақылау топтарында өлім-жітім байқалмады.

Алынған нәтижелер тримерлік конструкцияның *in vivo* жағдайындағы жоғары қорғаныш тиімділігін көрсетеді және бұл әсер оның вирустың табиғи тримерлі гликопротеинімен тиімдірек өзара әрекеттесуіне байланысты болуы мүмкін. Оң бақылау ретінде қолданылған ERIG толық қорғаныш көрсетті, ал тек вирус енгізілген теріс бақылау тобында өлім-жітім 100% құрады. Бұл нәтижелер қолданылған тәжірибелік модельдің сенімділігін растайды.

Мономерлік және димерлік наноантиденелердің *in vivo* жағдайындағы қорғаныш әсері бірдей деңгейде — 80% болды. Бұл димерлік форматтың антигенмен байланысу белсенділігін әрдайым арттыра бермейтінін көрсетеді. Мұндай нәтиже димерлік молекуланың кеңістіктік ұйымдасу ерекшеліктерімен немесе вирустық эпитоптардың орналасуына байланысты туындауы мүмкін стерикалық шектеулермен түсіндірілуі ықтимал.



А) Зертханалық жануарларға жүргізілген *in vivo* эксперименті.
В) Құтыру вирусымен жұқтырылған зертханалық жануарлардың өміршеңдік деңгейі

28-сурет *In vivo* зерттеу нәтижелері және зертханалық жануарлардың тірі қалу деңгейі [126]

In vivo тәжірибелерден алынған нәтижелер жанама ИФТ барысында алынған деректермен сәйкес келді. Антигенмен байланысу көрсеткіші жоғары болған тримерлік наноантидене жануарларды құтыру вирусының инфекциясынан қорғауда да жоғары тиімділік көрсетті. Бұл нәтижелер наноантиденеңің антигенмен байланысу қабілетінің оның қорғаныш әсерімен байланысты болуы мүмкін екенін көрсетеді.

Тримерлік конструкцияның жоғары қорғаныш тиімділігі оның аффинділігімен қатар, авидтілігінің артуымен де байланысты болуы ықтимал. Бірнеше байланысу учаскесінің бір мезгілде қатысуы наноантиденеңің вирустық бөлшекпен байланысын тұрақтандырып, нәтижесінде оның бейтараптандыру тиімділігін арттыруы мүмкін. Осы нәтижелер тримерлік VHH конструкцияларын құтыру вирусына қарсы иммунобиологиялық препараттарды әзірлеуде перспективалы кандидаттар ретінде қарастыруға негіз береді.

Алынған нәтижелерді нақтылау үшін әртүрлі құтыру вирусы штамдарына қатысты бейтараптандыру белсенділігін, сондай-ақ наноантиденелердің фармакокинетикалық қасиеттері мен организмдегі тұрақтылығын қосымша зерттеу қажет.

ҚОРЫТЫНДЫ

Құтыру ауруының жоғары өлім-жітімі және антирабиялық иммуноглобулиндердің қолжетімділігі мен қолданылуына байланысты шектеулер құтыру вирусына қарсы жаңа биотерапевтік препараттарды әзірлеу қажеттілігін көрсетеді. Осыған байланысты құтыру вирусының G гликопротеиніне (RABV-G) бағытталған наноантиденелерді алу және олардың функционалдық қасиеттерін зерттеу маңызды ғылыми міндеттердің бірі болып табылады.

Осы диссертациялық жұмыста құтыру вирусының G гликопротеиніне бағытталған рекомбинантты тримерлік антигенді алу, оған спецификалық наноантиденелерді бөліп алу және олардың құрылымдық-функционалдық қасиеттерін зерттеу бойынша кешенді зерттеулер жүргізілді. Сонымен қатар, алынған наноантиденелердің әртүрлі олигомерлік формаларының құтыру вирусымен байланысуы және *in vivo* жағдайындағы қорғаныш тиімділігі бағаланды.

1. Құтыру вирусы G гликопротеині эктодоменінің тримерлі формасын кодтайтын *rRABV-G-XVIII* гені құрастырылып, *E. coli* жүйесіне арналған pET-28c-*rRABV-G-XVIII* экспрессиялық плазмидасы алынды. Рестрикциялық және ПТР талдаулары рекомбинантты конструкцияның дұрыстығын растады.

2. *E. coli* SHuffle жүйесінде rRABV-GE және rRABV-G-XVIII ақуыздары экспрессияланып, тазартылды және рефолдинг арқылы ерігіш күйде алынды. rRABV-G-XVIII тұрақты тримерлік құрылым түзсе, rRABV-GE агрегацияға бейімділік көрсетті.

3. rRABV-G-XVIII жоғары иммуногенділік пен вирусты бейтараптандырушы белсенділік көрсетіп, тәжірибелік жануарларды құтыру вирусының өлімге әкелетін инфекциясынан 100% қорғады. rRABV-GE ақуызының иммуногенділігі мен қорғаныш тиімділігі төмен болды.

4. rRABV-G-XVIII арқылы иммундаудан кейін фагтық дисплей әдісімен VHH1 және VHH2 наноантиденелері алынды. Олардың ішінде VHH2 жоғары аффинділік көрсетіп, кейінгі зерттеулер үшін таңдалды.

5. VHH2 негізінде мономерлі, димерлі және тримерлі наноантидене конструкциялары алынып, *E. coli* жүйесінде экспрессияланды және тазартылды. Нативті PAGE талдауы VHH2-L-XVIII конструкциясының тұрақты тример түзетінін көрсетті.

6. ИФТ және *in vivo* зерттеулер нәтижесінде VHH2-L-XVIII тримерлік наноантиденесінің RABV-пен ең жоғары байланысу белсенділігін және 100% қорғаныш тиімділігін көрсететіні анықталды. Бұл конструкцияны құтыру вирусына қарсы перспективалы биотерапевтік кандидат ретінде қарастыруға негіз береді.

Бұл диссертациялық жұмыста қойылған мақсат пен міндеттер толық көлемде орындалды. Зерттеу нәтижесінде адамның XVIII типті коллагенінің тримерлендіруші доменімен тұрақтандырылған rRABV-G-XVIII рекомбинантты ақуызы алынды. Оның тұрақты тримерлі құрылым түзетіні, жоғары

иммуногенділік көрсететіні және тәжірибелік жануарларда құтыру вирусына қарсы қорғаныш әсер ететіні анықталды. Бұл нәтижелер rRABV-G-XVIII ақуызының құтыруға қарсы суббірлікті вакцина әзірлеуде перспективалы антиген ретінде қарастыруға мүмкіндік береді.

rRABV-G-XVIII негізінде алынған VHH2-L-XVIII тримерлі наноантиденесі құтыру вирусының гликопротеинімен жоғары байланысу белсенділігін және вирусты бейтараптандырушы әсерін көрсетті. Тримерлі конструкцияның тәжірибелік жануарларды қорғауда жоғары тиімділік көрсетуі оның құтыру вирусына қарсы биотерапевтік препараттарды әзірлеуде перспективалы кандидат екенін көрсетеді.

Осылайша, алынған нәтижелер rRABV-G-XVIII антигені мен оның негізінде құрастырылған тримерлі наноантиденелерді құтыруға қарсы жаңа иммунобиологиялық препараттарды әзірлеу бағытында әрі қарай зерттеуге негіз болады.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1. Ahmad T., Musa T.H., Jin H. Rabies in Asian Countries: Where we are stand? // Biomed. Res. Ther. – 2018. – № 5. – P. 2719-2720.

2. Профилактика бешенства: что нужно знать? // Министерство здравоохранения Республики Казахстан. – 2026. – URL: gov.kz (дата обращения: 19.09.2026).

3. Abdrakhmanov S.K., Korennoy F.I., Perez A.M. Animal Rabies in Kazakhstan: Stable Endemicity, Surveillance Pitfalls, and Priority Actions // Pathogens. – 2025. – № 14(11). – P. 1079.

4. Both L., Banyard A.C., van Dolleweerd C., Horton D.L., Ma J.K.C., Fooks A.R. Passive immunity in the prevention of rabies // The Lancet Infectious Diseases. – 2012. – № 12(5). – P. 397-407.

5 . de Kruif J., Bakker A.B.H., Marissen W.E., Kramer R.A., Throsby M., et al. A human monoclonal antibody cocktail as a novel component of rabies postexposure prophylaxis // Annual Review of Medicine. – 2007. – P. 359-368.

6. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains // Nature. – 1993. – № 363. – P. 446-448.

7. Morrison C. Nanobody approval gives domain antibodies a boost // Nature Reviews Drug Discovery. – 2019. – № 18. – P. 485-487.

8. Wang F., Chen J., Chen J.H., Liu X.M., Hu L.Q., Huo L.J. Enhancing the sensitivity of nanobodies through covalent and non-covalent polymerization // RSC Advances. – 2026. – № 16(5). – P. 3965-3975.

9. Botvinkin A., Poleschuk E., Kuzmin I., Borisova T., Gazarian S., Yager P., Rupprecht C. Novel lyssavirus isolated from bat in russia // Emerg Infect Dis.- 2003. – № 9(12) – P. 1623–1625.

10. Walker P.J., Freitas-Astúa J., Bejerman N., Blasdell K.R., Breyta R., Dietzgen R.G., Fooks A.R., Kondo H., Kurath G., Kuzmin I.V., et al. ICTV virus taxonomy profile: Rhabdoviridae 2022 // Journal of General Virology. – 2022. – № 103. – P. 001689.

11. Schnell M., Mcgettigan J., Wirblich C., Papaneri A. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. // Nature Reviews Microbiology. -2009. – № 8(1). - P. 51–61

12. Davis B., Rall G., Schnell M. Everything you always wanted to know about rabies virus (but were afraid to ask) // Annual review of virology. -2015.-№2(1).- P. 451

13. Скрипченко Г.С., А.И. Пономаренко, Т.М. Рыбакова. Исторические и современные аспекты бешенства/ Украінский медичий часопсис.-2003.-№4 (36).- С.61-68.

14. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология – Москва: Медицинское информационное агенство, 2005. – 529 бет.

15. Marston D., McElhinney L., Johnson N., Muller T., Conzelmann K., Tordo N., Fooks A. Comparative analysis of the full genome sequence of European bat

lyssajmb virus type 1 and type 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 30 non-translated region // Gen. Virol. – 2007. – № 88. – P. 1302–1314.

16. Yin, J., Wang, X., Mao, R., Zhang, Z., Gao, X., Luo, Y., Sun, Y. and Yin, X., 2021. Research advances on the interactions between rabies virus structural proteins and host target cells: accrued knowledge from the application of reverse genetics systems // Viruses. -2021.- №13(11). – P. 2288-2297.

17. Г.А. Баянды, Н.Н. Ахметсадыков, А.К. Бисенбаев. Молекулярная 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

18. Wunner W., Larson J., Dietzschold B., Smith C. The molecular biology of rabies viruses // Clinical Infectious Diseases. -1988. – Vol.10(4). – P. 771–784.

19. Fisher C.R., Streicker D.G., Schnell M.J. The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers // Nature Reviews Microbiology. – 2018. – № 16. – P. 241-255.

20. Finke S.; Granzow H.; Hurst J.; Pollin R.; Mettenleiter T. Intergenotypic replacement of lyssavirus matrix proteins demonstrates the role of lyssavirus m proteins in intracellular virus accumulation // Journal of Virology.- 2010.- № 84(4). – P. 1816–1827.

21. Finke S., Conzelmann K. Dissociation of rabies virus matrix protei functions in regulation of viral rna synthesis and virus assembly // Journal of Virology.- 2003.- № 77. – P. 12074–12082.

22. Ben Khalifa Y., Luco S., Besson B., Archambaud M., Grimes J., Larrous F., Bourhy H. The matrix protein of rabies virus binds to RelAp43 to modulate NF-kappaB-dependent gene expression related to innate immunity // Scientific Reports. – 2016.- № 6(1). – P.1-13.

23. Bauer A., Nolden T., Nemitz S., Perlson E., Finke S. Dynein light chain 1 binding motif in rabies virus polymerase l protein plays a role in microtubule reorganization and viral primary transcription // Journal of Virology . – 2015.- № 89. – P. 9591–9600.

24. Tian D., Luo Z., Zhou M., Li M., Yu L.,Wang C., Yuan J., Li F., Tian B., Sui, B.; et al. Critical Role of K1685 and K1829 in the large protein of rabies virus in viral pathogenicity and immune evasion. J. Virol. 2016, 90, 232–244.

25. Dietzschold B., Wiktor T.J., Macfarlan R., Varrichio A. Antigenic structure of rabies virus glycoprotein: ordering and immunological characterization of the large cnbr cleavage fragments // J. Virol. – 1982. – Vol. 44. – P. 595–602.

26. Etessami R., Conzelmann K., Fadai-Ghotbi B., Natelson B., Tsiang H., Ceccaldi P. And pathogenic characteristics of a G-deficient rabies virus recombinant: An in vitro and in vivo study // Journal of Virology. – 2000. – № 81. – P. 2147–2153.

27. Dhulipala S. and Uversky V. Looking at the pathogenesis of the rabies lyssavirus strain pasteur vaccins through a prism of the disorder-based bioinformatics // Biomolecules. – 2022.- № 12(10).-P. 1436.

28. Lafon M, Wiktor TJ, Macfarlan RI. Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies // Journal of General Virology.- 1983.- № 64.- P. 843-851.

29. Smith S.P., Wu G., Fooks A.R., Ma J. and Banyard A.C. Trying to treat the untreatable experimental approaches to clear rabies virus infection from the CNS // Journal of General Virology. – 2019.- № 100(8).- P.1171-1186.

30. Kim P.K., Keum S.J., Osinubi M.O., Franka R., Shin J.Y., Park S.T., Kim M.S., Park M.J., Lee S.Y., Carson W., Greenberg L., Development and characterization of novel chimeric monoclonal antibodies for broad spectrum neutralization of rabies virus // Plos one. – 2017. № 12(10). – e0186380.

31. Targovnik A.M., Ferrari A., Mc Callum G.J., Arregui M.B., Smith I., Bracco L.F., Alfonso V., López M.G., Martínez-Solís M., Herrero S., Miranda M.V. Highly efficient production of rabies virus glycoprotein G ectodomain in Sf9 insect cells // 3 Biotech. – 2019. – № 9. – P. 385.

32. Hemachudha T., Vinken P., Bruyn G, Klawans H. Rabies // Handbook of clinical neurology. – 1989.- P. 383–404.

33. Carter J.B., Saunders V.A. Virology: Principles and Applications. – Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2007. – 358 p33.

34. Hemachudha T., Laothamatas J., Rupprecht C. Human Rabies: A disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges // The Lancet Neurology. – 2002. – № 1(2). P. 101–109.

35. Ogino T. and Banerjee A. Unconventional mechanism of mRNA capping by the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus // Mol. Cell. – 2007. – № 25. – P. 85-97.

36. Lentz T., Burrage T., Smith A., Crick J., Tignor. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? // Science. – 1982. – № 215.- P. 182–84 44.

37. A.C. Banyard, Noël Tordo. Rabies pathogenesis and immunology. Revue Scientifique et TechniqueOffice International des Epizooties, 2018, 37 (2), pp.323-330. ff10.20506/rst.37.2.2805ff. ffpasteur04843557f

38. Finke S., Mueller-Waldeck R. & Conzelmann K.-K. (2003). – Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. J. Gen. Virol., 84 (6), 1613– 1621. doi:10.1099/vir.0.19128-0.

39. Finke S. & Conzelmann K.-K. (2003). – Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly. J. Virol., 77 (22), 12074–12082. doi:10.1128/JVI.77.22.12074-12082.2003.

40. Burrage T., Tignor G., Smith A. Rabies virus binding at neuromuscular junctions // Virus Research. – 1985. – № 2. – P. 273–289.

41. Charlton K. M, Nadin-Davis S., Casey G.A., Wandeler A.I. The long incubation period in rabies: delayed progression of infection in muscle at the site of exposure // Acta Neuropathol. – 1997.- № 94. – № 73–77.

42. Greene, C.E. Rabies and other lyssavirus infections // Lancet – 2004. – № 363. – P. 959–969.

43. Morimoto K., Patel M., Corisdeo S., Et Al. Characterization of a unique variant of bat rabies virus responsible for newly emerging human cases in North America // Proc Natl Acad Sci USA. – 1996. – № 93.- P. 5653–5658.

44. Gongal G., Wright A. Human rabies in the who Southeast Asia region: forward steps for elimination // Advances in Preventive Medicine. – 2011. – P. 1–5.

45. Hampson K., Coudeville L., Lembo T., Sambo M., Kieffer A., Attlan M., Barrat J., Blanton J.D., Briggs D.J., Cleaveland S., Costa P., Freuling C.M., Hiby E., Knopf L., Leanes F., Meslin F.X., Metlin A., Miranda M.E., Muller T., Nel L.H., Recuenco S., Rupprecht C.E., Schumacher C., Taylor L., Vigilato M.A., Zinsstag J., Dushoff J. Estimating the global burden of endemic canine rabies // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2015. – № 9.

46. Sugiyama M., Ito N. Control of rabies: epidemiology of rabies in Asia and development of new-generation vaccines for rabies. // Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. – 2007. – № 30(5-6). P. 273–286.

47. Knobel D., Cleaveland S., Coleman P. Et Al. Reevaluating the burden of rabies in Africa and Asia // Bulletin of the World Health Organization. – 2005. – Vol. 83, No 5. – P. 360–368.

48. Dodet B., Tejiokem M., Aguemon R., Bourhy H. Human rabies deaths in Africa: breaking the cycle of indifference // International Health. – 2014. – № 7(1). -P. 4–6.

49. World Health Organization experts. Expert consultation on rabies // WHO Technical Report Series 931. – Geneva: WHO, 2011. – P.

50. Xiaoyue Ma., Ben P., Lillian A., Crystal M., Jordana D, Richard B, Christine F. Rabies surveillance in the united states during 2019 // Journal of The American Veterinary Medical Association. – 2021. – № 221(12). – P. 1690-1701.

51. Matouch O., Vitasek J., Semerad Z., Malena M. Elimination of rabies in the Czech Republic // First International Conference on rabies in Europe, Kiev, Ukraine. – 2005. – Vol. 125. – P. 141-143.

52. Vigilato M., Cosivi O., Knöbl T., Clavijo A., Silva H. Rabies update for latin america and the Caribbean // Emerging infectious diseases. – 2013. – № 19(4). – P. 678-679

53. Aikimbayev A., Briggs D., Coltan G., et al. Fighting rabies in Eastern Europe, the Middle East and Central Asia—experts call for a regional initiative for rabies elimination // Zoonoses and Public Health. – 2014. – Vol. 61. – P. 219–226

54. Sultanov A. A., Abdrakhmanov S. K., Abdybekova A. M., Karatayev B. S., Torgerson P. R. Rabies in Kazakhstan // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2016. – Vol. 10(8). – doi: 10.1371/journal.pntd.0004889.

55. Lembo T. and partners. For rabies prevention. The blueprint for rabies prevention and control: A novel operational toolkit for rabies elimination // Plos Negl Trop Dis -2012.- №;6 (2).-P. 325-338

56. Yousaf M., Qasim M., Zia S., Rehman Khan M., Ur Ashfaq U., Khan S. Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment // Virology Journal. – 2012. – № 9(1). – P. 1-5.

57. Sasaki M.; Anindita P., Ito N., Sugiyama M., Carr M., Fukuhara H., Ose T., Maenaka K., Takada A., Hall W., et al. The Role of heparan sulfate proteoglycans as an attachment factor for rabies virus entry and infection // The Journal of Infectious Diseases. – 2018. – № 217. – P. 1740–1749.

58. World Health Organization. Rabies vaccines: WHO position paper – April 2018 // Weekly Epidemiological Record. – 2018. – Vol. 93, No. 16. – P. 201–220. – Available at: hdl:10665/272372.

59. Nunnally B. Vaccine Analysis Strategies, Principles, and Control // Springer. – 2014. – P. 63

60. Fooks, A. R., Cliquet, F., Finke, S., Freuling, C., Hemachudha, T., Mani, R. S., Banyard, A. C. Rabies // Nature Reviews Disease Primers.- 2017.-№ 3. – P. 1-19.

61. World Health Organization. Rabies – Human Vaccines**.** – World Health Organization (WHO). – Available at: https://www.who.int/. – Accessed: 1 Oct 2012.

62. Huang Y., Chen Z., Huang J., Fu Z., He B. Parainfluenza virus 5 expressing the G protein of rabies virus protects mice after rabies virus infection // Journal of Virology. – 2015. – Vol. 89(6). – P. 3427–3429.

63. Yang D. K., Kim H. H., Lee S. H., Jeong W. H., Tark D., Cho I. S.. A genetically modified rabies vaccine (ERAGS) induces protective immunity in dogs and cattle // Clinical and Experimental Vaccine Research. – 2017. – Vol. 6(2). – P. 128–134.

64. Sajjanar B., Dhusia K., Saxena S., Joshi V., Bisht D., Thakuria D., Manjunathareddy G., Ramteke P., Kumar S.. Nicotinic acetylcholine receptor alpha 1 (nAChR1) subunit peptides as potential antiviral agents against rabies virus // Biological Macromolecules. – 2017. – № 104. – P. 180–188.

65. Albertini A., Schoehn G, Weissenhorn W, Ruigrok R. Structural aspects of rabies virus replication // Cell. Mol. Life Sci. – 2008.- № 65(2).- P. 282—294.

66. Perrin P., Thibodeau L., Sureau P.. Rabies immunosome (subunit vaccine) structure and immunogenicity. Pre- and post-exposure protection studies // Vaccine. – 1985. – Vol. 3(3). – P. 325–332.

67. Faber M., Pulmanausahakul R., Hodawadekar S., Spitsin S., McGettigan J., Schnell M., Dietzschold B. Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response // Virology. – 2002. № 76. – P. 3374–3381

68. Tao L., Ge J., Wang X., Wen Z., Zhai H., Hua T., Zhao B., Kong D., Yang C., Bu Z. Generation of a recombinant rabies Flury LEP virus carrying an additional G gene creates an improved seed virus for inactivated vaccine production // Virology. – 2011. - № 8.- P. 454.

69. Zhang Y, Zhou M., Li Y., Luo Zh., Chen H., Cui M., Fu Zh.,Zhao L. Recombinant rabies virus with the glycoprotein fused with a DC-binding peptide is an efficacious rabies vaccine // Oncotarget. – 2018.- № 9. – P. 831-841.

70. Li Q. Q., Yan R. H., Bai N., Tan Z. L., Yu Q., Su H. Immunogenicity and antigenicity of the ectodomain of rabies virus glycoprotein stably expressed in HEK293T cells // International Journal of Medical Sciences. – 2023. – Vol. 20(10). – P. 1282–1292.

71. Zhou X. Y., Wang H. Z., Zhang J. C., Guan Y., Zhang Y. J. Single-injection subunit vaccine for rabies prevention using lentinan as adjuvant // International Journal of Biological Macromolecules. – 2024. – Vol. 254. – P. 128118.

72. Starodubova E. S., Kuzmenko Y. V., Pankova E. O., Latanova A. A., Preobrazhenskaya O. V., Karpov V. L.. Rabies virus glycoprotein with a consensus amino acid sequence and a lysosome targeting signal causes effective production of antibodies in DNA-immunized mice // Molecular Biology. – 2018. – Vol. 52(2). – P. 269–271.

73. Hellgren F., Cagigi A., Cerveira R. A., Ols S., Kern T., Lin A.. Unmodified rabies mRNA vaccine elicits high cross-neutralizing antibody titers and diverse B cell memory responses // Nature Communications. – 2023. – Vol. 14(1):3713.

74. Mcgettigan, J., David F., Figueiredo M., Minke J., Mebatsion T., Schnell M. Safety and serological response to a matrix gene-deleted rabies virus-based vaccine vector in dogs // Vaccine.- 2014. – № 32. – P. 1716–1719.

75. Cadoz M., Strady A., Meignier B., Taylor J., Tartaglia J., Paoletti E., Plotkin S. Immunisation with canarypox virus expressing rabies glycoprotein // Lancet North American Edition. – 1992. – Vol. 339(8807). – P. 1429–1432.

76. Sloan S. E., Hanlon C., Weldon W., Niezgoda M., Blanton J., et al. Identification and characterization of a human monoclonal antibody that potently neutralizes a broad panel of rabies virus isolates // Vaccine. – 2007. – Vol. 25. – P. 2800–2810.

77. Manko V. M., Devrishov D. A. Veterinary Immunology: Fundamental Principles // Moscow: Agrovet, 2011. – 752 p.

78. Lecocq Q., Zeven K., De Vlaeminck Y., Martens S., Massa S., Goyvaerts C., Raes G., Keyaerts M., Breckpot K., Devoogdt N. Noninvasive imaging of the immune checkpoint LAG-3 using nanobodies from development to preclinical use // Biomolecules. – 2019. – Vol. 9, № 10. – P. 548.

79. Greenberg A. S., Avila D., Hughes M., Hughes A., McKinney E. C., Flajnik M. F. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks // Nature. – 1995. – Vol. 374. – P. 168–173.

80. Seligmann M. et al. Heavy chain diseases: current findings and concepts // Immunological Reviews. – 1979. – Vol. 48. – P. 145–167.

81. Lafaye P., Li T. Use of camel single-domain antibodies for the diagnosis and treatment of zoonotic diseases // Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. – 2018. – Vol. 60. – P. 17–22.

82. Gonzalez-Sapienza G. et al. Single-domain antibodies as versatile affinity reagents for analytical and diagnostic applications // Frontiers in Immunology. – 2017. – Vol. 8. – P. 977.

83. Muyldermans S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies // Annual Review of Biochemistry. – 2013. – Vol. 82. – P. 17.1–17.23.

84. Woolven B. P. et al. The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation // Immunogenetics. – 1999. – Vol. 50(1–2). – P. 98–101.

85. Tilib S. V.. Camel Nanoantibody is an Efficient Tool for Research, Diagnostics and Therapy // Molecular Biology. – 2011. – Vol. 45(1). – P. 66–73.

86. Blanc M. R. et al. A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type γ-globulins from camelid sera // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2009. – Vol. 54(4). – P. 207–212.

87. Nguyen V. K. et al. The specific variable domain of camel heavy-chain antibodies is encoded in the germline // Journal of Molecular Biology. – 1998. – Vol. 275(3). – P. 413–418.

88. van der Linden R. et al. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama // Journal of Immunological Methods. – 2000. – Vol. 240(1–2). – P. 185–195.

89. Hassanzadeh-Ghassabeh G. et al. Nanobodies and their potential applications // Nanomedicine (London). – 2013. – Vol. 8(6). – P. 1013–1026.

90. Saerens D. et al. Antibody fragments as probes in biosensor development // Sensors (Basel). – 2008. – Vol. 8(8). – P. 4669–4686.

91. Nuttall S. D. et al. Isolation of a new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries // Molecular Immunology. – 2001. – Vol. 38(4). – P. 313–326.

92. Sunyer J. O.. Evolutionary and Functional Relationships of B Cells from Fish and Mammals: Insights into their Novel Roles in Phagocytosis and Presentation of Particulate Antigen // Infectious Disorders – Drug Targets. – 2012. – Vol. 12(3). – P. 200–212.

93. Tilib S. V. Camel Nanoantibody is an Efficient Tool for Research, Diagnostics and Therapy // Molecular Biology. – 2011. – Vol. 45(1). – P. 66–73.

94. Muyldermans S.. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies // Annual Review of Biochemistry. – 2013. – Vol. 82. – P. 17.1–17.23.

95. Goldman E. R. et al. Enhancing Stability of Camelid and Shark Single Domain Antibodies: An Overview // Frontiers in Immunology. – 2017. – Vol. 8. – P. 865.

96. Muyldermans S. et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology // Veterinary Immunology and Immunopathology. – 2009. – Vol. 128. – P. 178–183.

97. Van Heeke G. et al. Nanobodies as inhaled biotherapeutics for lung diseases // Pharmacology & Therapeutics. – 2017. – Vol. 169. – P. 47–56.

98. Harmsen M. M. et al. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features // Molecular Immunology. – 2000. – Vol. 37(10). – P. 579–590.

99. De Genst E. et al. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies // Proceedings of the National Academy of Sciences *(PNAS)*. – 2006. – Vol. 103(12). – P. 4586–4591.

100. Muyldermans S. et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology // Veterinary Immunology and Immunopathology. – 2009. – Vol. 128. – P. 178–183.

101. Tilib S. V. Camel Nanoantibody is an Efficient Tool for Research, Diagnostics and Therapy // Molecular Biology. – 2011. – Vol. 45(1). – P. 66–73.

102. Nguyen V. K. et al. Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire // EMBO Journal. – 2000. – Vol. 19(5). – P. 921–930.

103. Harmsen M. M., De Haard H. J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – Vol. 77(1). – P. 13–22.

104. Bessalah S., Jebahi S., Mejri N., Salhi I., Khorchani T., Hammadi M.. Perspective on therapeutic and diagnostic potential of camel nanobodies for coronavirus disease-19 (COVID-19) // 3 Biotech. – 2021. – Vol. 11(2). – P. 89.

105. Alexander E., Leong K. W.. Discovery of nanobodies: a comprehensive review of their applications and potential over the past five years // Journal of Nanobiotechnology. – 2024. – Vol. 22(1). – P. 661.

106. Morrison C. Nanobody approval gives domain antibodies a boost // Nature Reviews Drug Discovery. – 2019. – Vol. 18. – P. 485–487.

107. Darvish M., Behdani M., Shokrgozar M. A., Pooshang-Bagheri K., Shahbazzadeh D.. Development of protective agent against *Hottentotta saulcyi* venom using camelid single-domain antibody // Molecular Immunology. – 2015. – Vol. 68(2). – P. 412–420.

108. Yang Z. Y., Schmidt D., Liu W. L., Li S., Shi L. F., Sheng J. L., et al. A novel multivalent single-domain antibody targeting TcdA and TcdB prevents fulminant *Clostridium difficile* infection in mice // The Journal of Infectious Diseases. – 2014. – Vol. 210(6). – P. 964–972.

109. Lafaye P., Achour I., England P., Duyckaerts C., Rougeon F.. Single-domain antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid beta, prevent Aβ-induced neurotoxicity and inhibit fibril formation // Molecular Immunology. – 2009. – Vol. 46(4). – P. 695–704.

110. Шаталова А. В., Якубова А. С., Палимпсестов В. В., Есмагамбетов И. Б., Наноантитела: Строение, Получение, Применение (Обзор) // Разработка И Регистрация Лекарственных Средств. – 2019. – № 8(1). – P. 14-22.

111. Roovers R. C., Laeremans T., Huang L., De Taeye S., Verkleij A. J., Revets H., et al. Efficient inhibition of EGFR signalling and tumour growth by antagonistic anti-EGFR nanobodies // Cancer Immunology, Immunotherapy. – 2007. – Vol. 56(3). – P. 303–317.

112. Sroga P., Safronetz D., Stein D. R. Nanobodies: a new approach for the diagnosis and treatment of viral infectious diseases // Future Virology. – 2020. – Vol. 15. – P. 195–205.

113. Terryn S., Francart A., Rommelaere H., Stortelers C., Van Gucht S. Post-exposure treatment with anti-rabies VHH and vaccine significantly improves protection of mice from lethal rabies infection // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2016. – Vol. 10(8). – P. 1–15.

114. Boudko S. P. et al. Crystal structure of human collagen XVIII trimerization domain: A novel collagen trimerization Fold //Journal of molecular biology. – 2009. – Vol. 392. – №. 3. – P. 787-802.

115. Dion A. S., Myers J. C. COOH-terminal propeptides of the major human procollagens: structural, functional and genetic comparisons //Journal of molecular biology. – 1987. – Vol. 193. – №. 1. – P. 127-143.

116. Vincke C., Gutiérrez C., Wernery U., Devoogdt N., Hassanzadeh-Ghassabeh G, Muyldermans S. Generation of single domain antibody fragments derived from camelids and generation of manifold constructs // Methods Mol Biol. – 2012. – Vol. 907. – P. 145-76.

117. Terryn S., Francart A., Lamoral S. et al. Protective effect of different anti-rabies virus VHH constructs against rabies disease in mice // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9(10). – P. 1–12.

118. Areida S. K., Reinhardt D. P., Muller P. K., Fietzek P. P., Kowitz J., Marinkovich M. P., Notbohm H. Properties of the collagen type XVII ectodomain. Evidence for N- to C-terminal triple helix folding // Journal of Biological Chemistry. – 2001. – Vol. 276. – P. 1594–1601.

119. Ricard-Blum S. The collagen family // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2011. – Vol. 3, № 1. DOI: 10.1101/cshperspect.a004978.

120. Boudko S. P., Sasaki T., Engel J., Lerch T. F., Nix J., Chapman M. S., Bächinger H. P. Crystal structure of human collagen XVIII trimerization domain: a novel collagen trimerization fold // Journal of Molecular Biology. – 2009. – Vol. 392. – P. 787–802.

121. Sasaki T., Fukai N., Mann K., Göhring W., Olsen B. R., Timpl R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin // The EMBO Journal. – 1998. – Vol. 17. – P. 4249–4256.

122. Marneros A. G., Olsen B. R. The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis // Matrix Biology. – 2001. – Vol. 20, № 5–6. – P. 337–345.

123. Güttler T. et al. Neutralization of SARS-CoV-2 by highly potent, hyperthermostable, and mutation-tolerant nanobodies //The EMBO journal. – 2021. – Vol. 40. – №. 19. – С. e107985.

124. Nightingale C.H., Grant E.M., Quintiliani R. *In vitro* susceptibilities of bacterial pathogens from patients with bloodstream infections in the United States // Antimicrob Agents Chemother. – 2001. – Vol. 45, №10. – P. 2807-2812.

125. Boruah B.M., Liu D., Ye D., Gu T.-J., Jiang C.-L., Qu M., Wright E., Wang W., He W., Liu C., Gao B. Single domain antibody multimers confer protection against rabies infection // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, №8.

126. Разработка новых нанотел для эффективной нейтрализации и использования в качестве специфического и чувствительного реагента для быстрого обнаружения вируса бешенства: отчет о научно-исследовательской работе (заключительный) / НАО «КазНУ им. аль-Фараби»; рук. А.К. Бисенбаев, Алматы, 2024. - Шифр НТП AP14870256. - № государственной регистрации 0122PK00638; инв.№ 0322PK00886

127. Lathe R.F., Kieny M.P., Schmitt D., Curtiss P., Lecocq J.P. M13 bacteriophage vectors for the expression of foreign proteins in *Escherichia coli*: the rabies glycoprotein // J. Mol. Appl. Genet. – 1984. – Vol. 2. – P. 331-342.

128. Anilionis, A., Wunner, W. & Curtis, P. Structure of the glycoprotein gene in rabies virus //Nature.- 1981.- Vol. 294. – P. 275–278.

129. Yelverton E., Norton S., Obijeski J.F., Goeddel D.V. Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in *Escherichia coli* // Science. – 1983. – Vol. 219. – P. 614-620.

130. Bayandy G. A., Baltakhozha N. B., Sailauova G. N., Nurpeis K. B., Smekenov I. T., Bissenbaev A. K. Production of the soluble form of the rabies virus glycoprotein ectodomain as a subunit vaccine candidate // International Journal of Biology and Chemistry. – 2025. – Vol. 18, № 2. – P. 4–14. – DOI: 10.26577/IJBCh20251821.

131. Kieny M.P., Lathe R., Drillien R., Spehner D., Skory S., Schmitt D. Expression of rabies virus glycoprotein from recombinant vaccinia virus // Nature. – 1984. – Vol. 312. – P. 163-166.

132. Maillard A.P., Gaudin Y. Rabies virus glycoprotein can fold in two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type // Journal of General Virology. – 2002. – Vol. 83, Pt 6. – P. 1465-1476.

133. Cuesta A.M., Sanchez-Martın D., Sanz L., Bonet J., Compte M., Kremer L., Blanco F.J., Oliva B., Alvarez-Vallina L. In vivo tumor targeting and imaging with engineered trivalent antibody fragments containing collagen-derived sequences // PLoS One. – 2009. – Vol. 4. - № e5381.

134. Güttler T., Aksu M., Dickmanns A., Stegmann K.M., Gregor K., Rees R., Taxer W., Rymarenko O., Schünemann J., Dienemann C., Gunkel P., Mussil B., Krull J., Teichmann U., Groß U., Cordes V.C., Dobbelstein M., Görlich D. Neutralization of SARS-CoV-2 by Highly Potent, Hyperthermostable, and Mutation-Tolerant Nanobodies // EMBO J. – 2021. – Vol. 40. - № e107985.

135. Blanco-Toribio A., Álvarez-Cienfuegos A., Sainz-Pastor N., Merino N., Compte M., Sanz L., Blanco F., Álvarez-Vallina L. Bacterial secretion of soluble and functional trivalent scFv-based N-terminal trimerbodies // AMB Expr. – 2015. - Vol. 5. - № 45.

136. Gaudin Y. Rabies virus-induced membrane fusion pathway // J Cell Biol. – 2000. – Vol. 150, № 3. – P. 601-612.

137. Yang F., Lin S., Ye F., Yang J., Qi J., Chen Z., Lin X., Wang J., Yue D., Cheng Y., Chen Z., Chen H., You Y., Zhang Z., Yang Y., Yang M., Sun H., Li Y., Cao Y., Yang S., Wei Y., Gao G.F., Lu G. Structural analysis of rabies virus glycoprotein reveals pH-dependent conformational changes and interactions with a neutralizing antibody // Cell Host Microbe. - 2020.

138. Smekenov I., Bayandy G., Alybayev S., Baltakhozha N., Batanova Z., Akhmetsadykov N., Bissenbaev A. Immunogenicity and antigenicity of the recombinant ectodomain of rabies virus glycoprotein containing the human collagen XVIII trimerization domain // Vaccines. – 2025. – Vol. 13. – P. 971.

139. Berkmen M. Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli* // Protein Expr Purif. – 2012. – Vol. 82, №1. – P. 240-251.

140. Li J., de Marco A. Characterization and applications of nanobodies in molecular imaging and biotechnology // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2014. – Vol. 406, №. 13. – P. 3053–3063.

141. Mireille Dumoulin, Katja Conrath, Annemie Van Meirhaeghe, Filip Meersman, Karel Heremans, Leon G. J. Frenken, Serge Muyldermans, Lode Wyns, André Matagne. Single-domain antibody fragments with high conformational stability // *Protein Science. – 2002.* – Vol. 11, No. 3. – P. 500–515.