

*А.С.Оксанич, Т.Г.Самарцева, Е.Б.Файзулов, Н.Ф.Гаврилова,
И.В.Яковлева, В.В.Свиридов, В.В.Зверев*

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЛАЗМИДНОГО ВЕКТОРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ХИМЕРНЫХ АНТИТЕЛ ЗАДАННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Получение универсальных генетических конструкций, кодирующих синтез легкой и тяжелой цепей химерного антитела, а также методических подходов для получения химерных антител заданной специфичности на примере моноклональных антител к дифтерийному токсину (ДТ) DT-17 в культуре клеток CHO и оценка их иммунохимических и эффекторных свойств. *Материалы и методы.* Методом ПЦР были получены гены вариабельных областей легких и тяжелых цепей мышиноного антитела к дифтерийному токсину DT-17 и клонированы в плазмидном векторе pCI-neo. Генно-инженерными методами был получен «супервектор» SV DT-17neo, содержащий гены химерного антитела. С использованием культуральных методов «супервектором» была трансфицирована культура клеток CHO и получен высокопродуктивный клон, секретирующий химерные антитела к ДТ. Для оценки активности антител применяли иммунохимические методы, а для получения препаративного количества антител — аффинную хроматографию. *Результаты.* Были получены универсальные векторы pLK DT-17 и pHG DT-17, содержащие гены легкой и тяжелой цепей химерного антитела к ДТ DT-17, где гены вариабельных и константных областей были фланкированы сайтами рестрикции эндонуклеаз, что позволяет изменять специфичность антител, а в перспективе даст возможность перейти к исследованиям по изменению класса и видовой принадлежности химерного иммуноглобулина. При трансфекции культуры клеток CHO полученными векторами отмечалось накопление антител к ДТ в культуральной жидкости. Выход очищенных химерных антител DT-17 составил 4 мг с 1 л культуральной среды. Минимальная концентрация химерных антител, при которой наблюдалась нейтрализация ДТ в культуре клеток CHO, составила 30 мкг/мл среды. *Заключение.* Были сконструированы универсальные плазмиды, кодирующие синтез легкой и тяжелой цепей химерного антитела DT-17. На основе векторов был получен «супервектор» и высокопродуктивный клон, секретирующий специфические антитела, которые обладали нейтрализующей активностью в отношении ДТ.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 56—63

Ключевые слова: иммуноглобулиновые гены, «супервектор», химерные антитела, дифтерийный токсин, токсиннейтрализующая активность

*A.S.Oksanich, T.G.Samartseva, E.B.Faizulov, N.F.Gavrilova,
I.V.Yakovleva, V.V.Sviridov, V.V.Zverev*

PLASMID DESIGN FOR PRODUCTION OF CHIMERIC ANTIBODIES WITH DEFINED SPECIFICITY IN EUKARYOTES

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. In this study we aimed to design the universal genetic construction expressing the light and heavy chains of a chimeric antibody, to develop methodological approaches for the production of chimeric antibodies with defined specificity using the monoclonal antibodies to diphtheria toxin (DT) DT-17 in the CHO cells as an example and to evaluate their immunochemical and effector properties. *Materials and methods.* Variable region genes of the light and heavy chains of mouse antibodies DT-17 to diphtheria toxin were obtained by PCR method and cloned into pCI-neo plasmid vector. The SV DT-17neo «supervector» containing the genes of a chimeric antibody was constructed by using of genetic engineering techniques. CHO cells were transfected with «supervector» and a highly productive clone secreting chimeric antibodies to DT were collected.

Immunochemical methods were used to evaluate antibody activity, and affinity chromatography was used to prepare preparative amounts of the antibodies. *Results.* Universal vectors pLK DT-17 and pHG DT-17 containing light and heavy chain genes of the chimeric antibodies DT-17 to DT were constructed. The variable and constant region genes were flanked by endonuclease restriction sites, which allows to change the specificity of the antibodies. In the future it will make possible to study the modifications of the class and species specificity of the chimeric immunoglobulins. When the CHO cell culture was transfected with the designed vectors, the accumulation of antibodies to DT in the culture medium was detected. The yield of purified DT-17 chimeric antibodies was 4 mg per 1 liter of culture medium. The minimum concentration of chimeric antibodies necessary for DT neutralization in the CHO cells was 30 µg/mL. *Conclusion.* Universal plasmids encoding the synthesis of light and heavy chains of chimeric DT-17 antibody have been designed. On the basis of these vectors, a «supervector» and a highly productive clone secreting specific antibodies that had neutralizing activity against DT were obtained.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 56–63

Key words: immunoglobulin genes, «supervector», chimeric antibodies, diphtheria toxin, toxin neutralizing activity

ВВЕДЕНИЕ

Иммуноглобулины, благодаря своей уникальной способности специфически распознавать все многообразие антигенов, в настоящее время являются основой для широкого их применения как средства терапии и профилактики инфекционных заболеваний. Для антител, применяемых в терапии инфекционных заболеваний, отдается предпочтение изологичным препаратам, полученным от доноров. В то же время, препараты специфических антител получают также из крови иммунизированных животных, трансгенных животных с чужеродными генами иммуноглобулинов, из гибридных клеточных культур и др. [7].

Антисыворотки, полученные от животных, можно использовать для терапии различных заболеваний человека, но при этом возможны нежелательные побочные эффекты в виде аллергических реакций вплоть до анафилактического шока или образование собственных антител к белкам сыворотки животного [3].

Что касается человеческих антисывороток, то их использование ограничивается дефицитом сырьевой базы донорских сывороток, сложностью стандартизации, кроме того, существует риск заражения пациента редкими патогенами, такими как прионы или мало изученные вирусы.

С развитием технологии генетической инженерии открылись перспективы в области использования рекомбинантной ДНК для получения мини-антител, химерных и гуманизированных антител, широко используемых в научных исследованиях и медицине [1].

В настоящее время различными фармацевтическими компаниями производятся десятки препаратов на основе моноклональных гуманизированных антител. Как правило, эти антитела входят в состав препаратов для лечения онкологических заболеваний, таких как В-клеточный лейкоз, миелолейкоз, лимфома, рак молочной железы, рак кишечника. Кроме того, гуманизированные антитела используют для химиотерапии ревматоидного артрита, псориаза и при трансплантации внутренних органов для профилактики отторжения [2, 5, 6, 8, 9].

Целью настоящей работы была разработка универсальных генетических конструкций, кодирующих синтез легкой и тяжелой цепей химерного (мышь/

человек) антитела, а также методических подходов для получения химерных антител заданной специфичности на примере моноклональных антител к дифтерийному токсину DT-17 в культуре клеток CHO и оценка их иммунохимических и эффекторных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовалась гибридома DT-17, продуцирующая моноклональные антитела, которые обладают нейтрализующей активностью в отношении дифтерийного токсина.

Гибридомы-продуценты антител к дифтерийному токсину культивировали на среде RPMI 1640 с добавлением 10% сыворотки плода коровы и глутамина. После восстановления криоконсервированных гибридных клонов перед выделением из них мРНК их культивировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение нескольких суток. Морфологию клеток оценивали под инвертированным микроскопом, их антителообразующую способность и активность антител в культуральной среде — в ИФА. При сохранности специфичных для каждого клона характеристик, клетки, взятые на стадии экспоненциального роста, осаждали центрифугированием; осадок клеток использовали для выделения суммарной РНК с использованием набора реагентов RNeasy Mini Kit (Qiagen).

Праймеры для амплификации участков генов, кодирующих переменные фрагменты тяжелой и легкой цепей мышинных IgG, праймеры для амплификации генов константных фрагментов IgG1 человека подбирали, руководствуясь имеющимися в литературе данными и базами данных нуклеотидных последовательностей мРНК человека и мыши. Олигонуклеотиды синтезировали в компании «Синтол».

Обратную транскрипцию выделенной РНК с подобранными праймерами, амплификацию доменов переменных участков моноклональных иммуноглобулинов мыши, а также встраивание их в плазмиду, секвенирование ампликонов и плазмиды для контроля правильности полученной конструкции проводили в соответствии со стандартными методами генной инженерии.

Культуру клеток CHO культивировали на питательных средах RPMI (Панэко) или Opti-MEM (Invitrogen) с добавлением и без добавления фетальной бычьей сыворотки (FBS, Gibco) в количестве 2,5 — 5%, для трансфекции использовали реактив Lipofectamine 2000 (Invitrogen), для аффинной очистки иммуноглобулинов — протеин-G сепарозу (Биалекса).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из гибридомы DT-17, продуцирующей моноклональные антитела к дифтерийному токсину, выделяли суммарную РНК с использованием олигонуклеотинового праймера (T18) на ее матрице в реакции обратной транскрипции получали кДНК. Для амплификации участков, кодирующих переменные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина G мыши, использовали универсальные праймеры, описанные Imai S. et al. [4]. Полученные ПЦР-продукты секвенировали и на основании последовательностей генов переменных областей с использованием базы данных IMGT (International Immunogenetics Information System, www.imgt.cines.fr) подбирали нуклеотидные последовательности наиболее близких лидерных областей как для легкой, так и для тяжелой цепей.

Для получения генов константных областей тяжелой цепи человека из

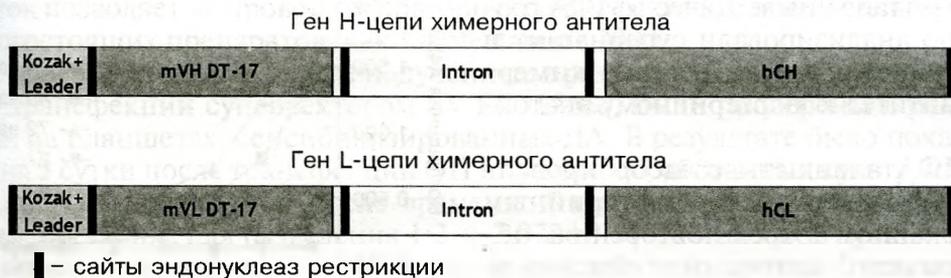


Рис. 1. Схематическое изображение структуры генов тяжелой и легкой цепей химерного антитела к дифтерийному токсину/анатоксину.

mVH и mVL — варибельные участки генов тяжелой и легкой цепей мышиноного моноклонального антитела DT-17; hCH и hCL — константные участки генов тяжелой и легкой цепей IgG1(γ) человека.

моноклеаров периферической крови донора была выделена суммарная РНК. С использованием праймера T18 и праймеров для получения генов константных областей тяжелой цепи IgG человека (hCH1f 5'-TTT CTA GAA TGG CCT CCA CCA AGG GCC CA-3'; hCH1r 5'-TTC TCG AGT CAT TTA CCC GGA GAC AGG GAG A-3'), в реакции ОТ и ПЦР были получены фрагменты ДНК, кодирующие константные области тяжелой цепи. Для получения фрагмента гена константной области легкой цепи каппа на матрице геномной ДНК из моноклеаров периферической крови донора проводили ПЦР с использованием специфических праймеров (hCLKf 5'-TTT CTA GAA TGC GAA CTG TGG CTG CAC CA-3'; hCLKr 5'-TTC TCG AGC TAA CAC TCT CCC CTG TTG AAG CTC-3').

На основе данных о нуклеотидных последовательностях генов лидерных и варибельных областей легкой и тяжелой цепей мышиноного моноклонального антитела DT-17 и константных областей легкой и тяжелой цепей IgG человека была спроектирована нуклеотидная последовательность, кодирующая синтез химерных легкой и тяжелой цепей, структура которых показана на рис. 1.

Согласно спроектированным последовательностям в компании Евроген (Россия) были синтезированы гены химерных легкой и тяжелой цепей. Для экспрессии спроектированных генов в клетках млекопитающих был использован эукариотический плазмидный вектор pCI-neo (Promega), который в своем составе содержит предранний цитомегаловирусный промотор, сайт полиаденилирования и ген устойчивости к антибиотику G418 (Geneticin). В результате клонирования были получены два вектора: первый кодировал легкую цепь химерного антитела (pLK DT-17) к дифтерийному токсину, а второй — тяжелую цепь (pHG DT-17).

С целью оценки продукции химерных антител к дифтерийному токсину проводили трансфекцию рекомбинантными плазмидами клеток CHO. Трансфекцию каждой плазмидой по отдельности и ко-трансфекцию обеими плазмидами проводили с использованием реагента для трансфекции Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Для контроля эффективности трансфекции использовали плазмиду с геном красного флуоресцентного белка pTurboRFP-C (Евроген, Россия). Через одни, двое и трое суток после трансфекции соскребали монослой клеток и перенесли вместе с культуральной жидкостью в отдельные пробирки, центрифугировали и отбирали надосадочную жидкость, а осадок суспендировали в фосфатно-солевом буфере и лизировали клетки трехкратным заморажива-

нием-оттаиванием. Далее в ИФА раздельно анализировали супернатант и лизат клеток — на наличие химерных антител к дифтерийному анатоксину.

ИФА планшеты с адсорбированным на поверхности дифтерийным анатоксином в трех повторениях обрабатывали 2-кратными разведениями препаратов, полученных в результате трансфекции, и проявляли конъюгатом, специфичным к Fc-фрагменту человеческих иммуноглобулинов G. В результате было показано, что на 2 и 3 сутки после трансфекции в культуральной жидкости имело место накопление антител, специфичных к дифтерийному анатоксину (ДА). При этом значение ОП в препаратах культуральной жидкости и лизата клеток, полученных в результате ко-трансфекции рекомбинантными плазмидами, достоверно превышало ОП в препаратах, полученных в результате трансфекции контрольной плазмидой рTurboRFP-C и К- (нетрансфицированная культура клеток СНО) до разведения 1:64 (рис. 2).

В образцах лизатов нетрансфицированных клеток, а также в препаратах, полученных в результате трансфекции каждой плазмидой по отдельности, проанализированных методом ИФА, достоверной разницы в ОП между опытными и контрольными образцами выявлено не было. При проявлении реакции ИФА антимишиным конъюгатом разницы между ОП в опытных и контрольных образцах также выявлено не было, что подтверждает химерность полученных антител.

Химерные антитела также были проверены в реакции латекс-агглютинации и конкурентном ИФА с мышинными материнскими моноклональными антителами DT-17, где также была подтверждена их специфичность к ДА и антигенсвязывающая способность (данные не приводятся).

На следующем этапе из двух рекомбинантных плазмид, кодирующих последовательности легкой и тяжелой цепей химерного антитела, был получен «супервектор» SV DT-17neo, объединяющий в одной плазмиде гены обеих цепей иммуноглобулина.

Наличие в «супервекторе» гена устойчивости к антибиотику G418 (Geneticin) позволило получить стабильно трансфицированную плазмидой SV DT-17neo культуру клеток СНО путем ее выращивания в токсичной концентрации антибиотика G418. Использование подобной культуры

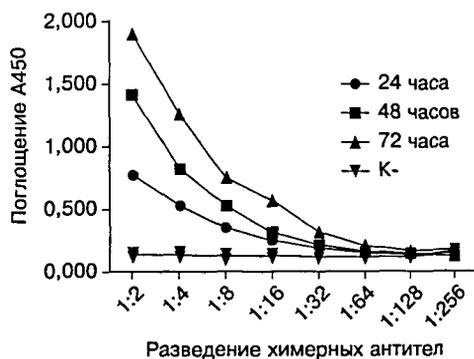


Рис. 2. Динамика накопления химерных антител к дифтерийному анатоксину в культуральной жидкости через 24, 48 и 72 часа после временной ко-трансфекции клеток СНО плазмидами rLKG DT-17 и rHG DT-17, кодирующими легкую и тяжелую цепи химерного антитела DT-17 соответственно.

К- нетрансфицированная культура клеток СНО.

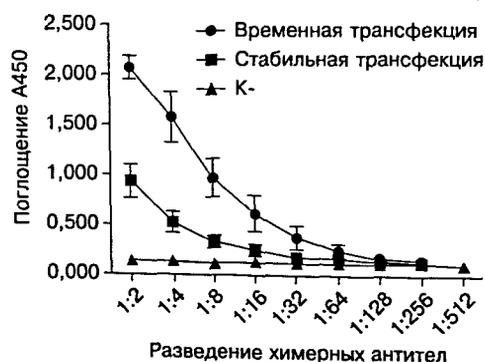


Рис. 3. Продукция химерных антител клетками СНО после временной и стабильной трансфекции «супервектором» SV DT-17neo.

клеток позволяет не проводить повторную трансфекцию с применением таких дорогостоящих препаратов, как Lipofectamine 2000.

Химерные антитела к ДА, полученные в результате временной и стабильной трансфекции супервектором SV DT-17neo, были проверены в реакции ИФА на планшетах, сенсбилизированных ДА. В результате было показано, что на 3 сутки после трансфекции ОП в лунках, обработанных культуральной жидкостью, полученной после временной трансфекции вектором SV DT-17neo, составила для разведения 1:2 — $2,072 \pm 0,119$, тогда как в лунках, обработанных препаратами, полученными от стабильно трансфицированной культуры клеток СНО — $0,939 \pm 0,168$ (рис. 3). Также было обнаружено, что в лизатах стабильно трансфицированных супервектором клеток СНО химерные антитела практически не выявляются.

Получение стабильно трансфицированной вектором SV DT-17neo культуры клеток СНО позволило на следующем этапе приступить к клонированию с целью выведения высокопродуктивного клона СНО, секретирующего в большом количестве специфические химерные антитела к ДА. Для этого в культуре клеток СНО, стабильно трансфицированной вектором SV DT-17neo и образовавшей монослой, проводили подсчет клеток. Затем доводили концентрацию клеток с использованием ФСБ (рН 7,4) до одной клетки в микролитре. Разносили по 1 мкл суспензии клеток в 96-луночный планшет и под микроскопом отмечали те лунки, где визуализировалось по 1 клетке. В лунки вносили по 100 мкл RPMI с 5% фетальной бычьей сывороткой и столько же аналогичной кондиционированной среды. Ежедневно под световым микроскопом контролировали состояние клеток и рН среды (по цвету), через 5 — 7 дней клетки трипсинизировали и заменяли питательную среду. Примерно на 12 — 14 день во всех лунках формировался монослой на 80 — 100%. Из лунок планшета, где сформировался монослой, отбирали среду для анализа содержания химерных антител к ДА методом ИФА. По результатам ИФА отбирали самые высокопродуктивные клоны СНО и переносили их в культуральные флаконы для размножения и формирования музея. Было отмечено, что если за 14 дней до клонирования СНО увеличить токсическую дозу G418 в 2 раза, происходит 3 — 6-кратное увеличение доли высокопродуктивных клонов относительно посеянных на клонирование клеток, эта процедура существенно снизила трудоемкость клонирования.

Всего было проанализировано 319 клонов, трансфицированных супервектором SV DT-17neo. Для дальнейшей работы был отобран один клон-продуцент химерных антител DT-17 с титром антител 1:512, который был использован для накопления антитело-содержащей культуральной жидкости. Культуральную жидкость осветляли центрифугированием, фильтровали через бумажный фильтр и проводили аффинную очистку на протеин-G сефарозе. Сконцентрированные антитела диализовали и стерилизовали фильтрованием через фильтр с мембраной PES и диаметром пор 0,22 мкм. Выход антител в элюате составил 4 мг/л культуральной среды. Очищенные антитела использовали для оценки токсиннейтрализующей активности в реакции нейтрализации дифтерийного токсина (ДТ) в культуре клеток СНО. Для этого химерные антитела DT-17 разводили с 2-кратным шагом, после чего смешивали с ДТ и смесь вносили в 96-луночные планшеты к монослою культуры клеток СНО. Результаты оценивали по изменению окраски культуральной среды. Нейтрализующая активность химерных антител DT-17 с ДТ в культуре клеток СНО наблюдалась при концентрации антител не менее 30 мкг на 1 мл культуральной среды.

ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящая работа была направлена на получение универсальных генетических конструкций, которые позволяют в короткие сроки получать химерные антитела из гибридомы, продуцирующей мышинные моноклональные антитела нужной специфичности, с использованием стандартного комплекса методов. Для реализации цели при проектировании генов химерного антитела переменные и константные области иммуноглобулина, а также гены лидерных последовательностей были фланкированы сайтами рестрикции редкощеплящих эндонуклеаз, что дает принципиальную возможность на основе созданных конструкций получать моноклональные антитела различной специфичности, разных классов и изотипов. Для повышения уровня экспрессии генов химерных иммуноглобулинов между константными и переменными областями обеих цепей была интегрирована нуклеотидная последовательность химерного интрона, а перед переменными областями — участок, кодирующий лидерный пептид и сайт Козака. Особенностью разработанных конструкций является то, что сайты рестрикции были интегрированы непосредственно в 5'-концы генов лидерных пептидов легкой и тяжелой цепей без потери секретирующей способности иммуноглобулинов из комплекса Гольджи, а также в 3'- и 5'-концы интрона с сохранением узнавания его сигнальных последовательностей для мРНК. Таким образом, модификации, внесенные в гены легкой и тяжелой цепей химерного иммуноглобулина, не затрагивают непосредственно переменные и константные участки, что позволяет создавать химеры любой не только антигенной, но в перспективе классовой и видовой специфичности, что может быть актуально, в том числе и для ветеринарных нужд в племенном животноводстве.

В работе были получены рекомбинантные векторы pLK DT-17 и pHG DT-17, при ко-трансфекции которыми клеток СНО в культуральной жидкости получали полноразмерные химерные антитела, обладающие антигенной специфичностью мышинного моноклонального антитела DT-17. С использованием полученного «супервектора» SV DT-17neo была создана стабильно трансфицированная культура клеток СНО, продуцирующая антитела к дифтерийному токсину. Показано, что получаемые антитела являются химерными, то есть содержат мышинные антиген-распознающие переменные фрагменты и человеческий Fc-фрагмент, они секретируются из клеток и обладают специфичностью к дифтерийному токсину/анатоксину. Также было обнаружено, что в лизатах стабильно трансфицированных супервектором клеток СНО химерные антитела практически не выявляются, то есть они в основном секретируются во внешнюю среду, а не накапливаются в клетках, как наблюдалось при ко-трансфекции клеток двумя плазмидными векторами pLK DT-17 и pHG DT-17. Несмотря на то, что выход специфических антител к ДТ в культуральной жидкости стабильно трансфицированной культуры клеток СНО оказался ниже в 2 раза, чем при временной трансфекции, что закономерно, этот этап необходимо проводить для дальнейшего получения высокопродуктивных клонов.

Для получения готовых очищенных и сконцентрированных препаратов были предложены стандартные общепринятые простые и недорогие методики, что позволило получить высокий выход и активность конечного препарата химерных антител. Предполагается внести модификации в некоторые методики, использованные в работе, что позволит увеличить выход антител в единице объема культуральной среды и удешевить процедуру очистки антител.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-15-01525.

ЛИТЕРАТУРА

1. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения. *Acta Naturae*. 2009, 1: 32-50.
2. Деев С.М., Лебеденко Е.Н., Петровская Л.Е., Долгих Д.А., Габитов А.Г., Кирпичников М.П. Неприродные антитела и иммуноконъюгаты с заданными свойствами: оптимизация функций через направленное изменение структуры. *Успехи химии*. 2015, 84 (1): 1-26.
3. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М., Мир, 2000.
4. Imai S., Mukai Y., Nagano K. et al. Quality enhancement of the non-immune phage scFv library to isolate effective antibodies. *Biol. Pharm. Bull.* 2006, 29 (7): 1325-1330.
5. Kreitman R.J. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS J.* 2006, 8 (3): 532-551.
6. Pai L.H., Wittes R., Setser A. et al. Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: an antibody linked to *Pseudomonas* exotoxin. *Nat. Med.* 1996, 2: 350-353.
7. Redwan R.M. Animal-derived pharmaceutical proteins. *J. Immunoassay Immunochem.* 2009, 30 (3): 262-290.
8. Teicher B.A., Chari R.V. Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. *Clin. Cancer. Res.* 2011, 17 (20): 6389-6397.
9. Witzig T.E. Radioimmunotherapy for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2006, 19: 655-668.

Поступила 10.07.17

Контактная информация: Оксанич А.С.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*Г.И.Алаторцева¹, А.В.Сидоров¹, Л.Н.Нестеренко¹, Л.Н.Лухверчик¹,
М.В.Жукина¹, И.И.Амиантова¹, А.В.Милованова¹, Д.С.Воробьев¹,
Ю.И.Амур¹, М.И.Михайлов^{1,2}, К.К.Кюрегян^{1,2}, В.С.Кичатова^{1,2},
И.А.Потемкин^{1,2}, О.В.Исаева^{1,2}, Е.Ю.Малинникова^{1,2},
А.А.Карлсен^{1,2}, В.М.Блинов¹, З.Ш.Нурматов³, А.З.Нурматов³,
О.Т.Касымов³, С.В.Жаворонок⁴, В.В.Зверев¹*

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ORF3 ВИРУСА ГЕПАТИТА Е 1 ГЕНОТИПА С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ОПТИМИЗАЦИИ КОДОНОВ

¹НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, ²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия; ³НПО «Профилактическая медицина», Бишкек, Кыргызская Республика; ⁴Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

Цель. Получение рекомбинантного аналога полноразмерного белка ORF3 вируса гепатита Е (ВГЕ) 1 генотипа. **Материалы и методы.** Штаммы *Escherichia coli*, плазмидные векторы, серологический и клинический материал, иммуноферментные тест-системы. Молекулярно-биологические, биоинформационные, биотехнологические, биохимические и серологические методы. **Результаты.** Из препарата РНК ВГЕ 1 генотипа, выделенного от больного из Киргизии, получена рекомбинантная плазида, содержащая ДНК копию субгеномной вирусной РНК. С использованием данной плазмиды получены штаммы *E.coli* — продуценты рекомбинантного антигена ORF3 ВГЕ 1 генотипа в виде слитного с β-галактозидазой *E.coli* полипептида, содержащего полноразмерную копию белка ORF3. Для повышения уровня экспрессии рекомбинантного белка проведена оптимизация кодонов клонированного фрагмента кДНК. Рекомбинантный белок ORF3 выделен из телец-включений биомассы штамма-продуцента и очищен методом эксклюзионной хроматографии. Антигенная специфичность полученного полипептида подтверждена методами иммуноферментного анализа и вестерн-блоттинга со специфическими сыворотками. **Заключение.** Разработан рекомбинантный антиген ORF3 ВГЕ 1 генотипа и экспериментально показана возможность его применения в диагностических тестах.