

УДК 577.112.083:571.27

# Рекомбинантные антитела к гликопротеину вируса Эбола

А. А. Панина<sup>1\*</sup>, И. Г. Дементьева<sup>2</sup>, Т. К. Алиев<sup>3</sup>, В. А. Топорова<sup>1</sup>, Д. С. Балабашин<sup>1,4</sup>, М. Н. Боков<sup>2</sup>, Л. П. Позднякова<sup>2</sup>, О. Б. Шемчукова<sup>2</sup>, Д. А. Долгих<sup>1,4</sup>, П. Г. Свешников<sup>2</sup>, М. П. Кирпичников<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>2</sup>Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, 117149, Москва, Симферопольский бульвар, 8

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

<sup>4</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: paniann07@yandex.ru, panina@mx.ibch.ru

Поступила в редакцию 27.04.2017

Принята к печати 24.10.2017

**РЕФЕРАТ** В настоящее время не существует лицензированных препаратов для адресной профилактики и лечения геморрагической лихорадки Эбола. В представленной работе создана эукариотическая система экспрессии для получения трех полноразмерных химерных антител IgG1-каппа изотипа GPE118, GPE325 и GPE534 к рекомбинантному гликопротеину вируса Эбола (GP EBOV), ключевому фактору патогенности этого вируса. Иммунохимические свойства химерных антител изучены методами иммуноблоттинга, непрямого, прямого и конкурентного иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантных белков rGPdTM, NP и VP40 вируса Эбола. Доказана подлинность полученных антител и отсутствие перекрестной специфичности по отношению к структурным белкам NP и VP40 вируса Эбола. Эпитопная специфичность рекомбинантных антител исследована с использованием коммерческих нейтрализующих антител к вирусному гликопротеину. Показано, что рекомбинантные антитела GPE118, GPE325 и GPE534 узнают эпитопы гликопротеина, совпадающие или перекрывающиеся с эпитопами трех хорошо изученных нейтрализующих антител против вируса Эбола.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** вирус геморрагической лихорадки Эбола, терапевтические рекомбинантные химерные антитела.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** mAT – моноклональные антитела; EBOV – вирус геморрагической лихорадки Эбола; EBOV GP – гликопротеин вируса геморрагической лихорадки Эбола; rGPdTM – рекомбинантный гликопротеин вируса геморрагической лихорадки Эбола без трансмембранного домена; NP – нуклеопротеин вируса Эбола; VP40 – структурный белок вируса Эбола; SOE-PCR – ПЦР с перекрывающимися областями; IEDB – Международная база данных эпитопов; PBS – фосфатно-солевой буфер.

## ВВЕДЕНИЕ

Во время последней эпидемии геморрагической лихорадки Эбола количество зараженных превысило 28 тысяч и зафиксировано более 11 тысяч летальных исходов. Несмотря на прекращение эпидемии, Всемирная организация здравоохранения не исключает возможности новой вспышки заболевания. В связи с этим необходимо активизировать разработку эффективных средств профилактики и терапии заболевания.

За последние 10 лет предложено несколько подходов к терапии лихорадки Эбола. Так, внутривен-

ное введение ингибиторов коагуляции крови, таких, как рекомбинантный активированный белок С человека, повышает выживаемость больных на 18% [1]. Внутривенное введение малых интерферирующих РНК приводит к повышению выживаемости от 66 до 100% в зависимости от количества инъекций [2]. Однако необходимо подчеркнуть, что лечение необходимо начинать в течение первых 30–60 мин от момента заражения.

Разработка терапевтических антител против вируса лихорадки Эбола проводится начиная с 1990-х годов. Из восьми белков вируса ключевой мишенью

для иммунотерапии считается главный фактор патогенности – гликопротеин GP. Нестабильные результаты получены при использовании отдельных моноклональных антител (мАТ) или антител из крови больных, перенесших лихорадку Эбола [3]. Вместе с тем, в опытах на приматах показано, что, в отличие от неспецифических средств антивирусной терапии, пассивная иммунизация антителами, введенными через 24 ч после инфицирования, позволяет добиться терапевтического эффекта [4]. С целью создания средств монотерапии продолжают попытки поиска источников нейтрализующих антител в крови пациентов, перенесших заболевание [5]. Однако в процессе получения и исследования мАТ против GP было установлено, что наиболее значительный защитный эффект и существенное снижение летальности на модельных животных обеспечивал «коктейль» антител ZMapp – комбинация антител, специфичных к различным эпитопам GP [6]. На морских свинках и макаках резус были испытаны различные комбинации трех химерных антител, специфичных к GP. Животных (18 обезьян) инфицировали летальными дозами вируса и на 3-и, 4-е и 5-е сут после этого вводили препарат ZMapp в дозе 50 мг/кг веса. Оказалось, что ZMapp обеспечил выживаемость всех 18 обезьян, в том числе и животных с выраженными признаками заболевания. Антитела, составляющие комбинацию ZMapp, были экспрессированы в листьях табака и применены в период эпидемии 2014 г. в Западной Африке [7]. В сравнении с группой пациентов, получавшей только паллиативную терапию, уровень смертности в группе, получавшей также исследуемый препарат, был снижен с 37% (13 из 35) до 22% (8 из 36). Применение препарата на большем количестве пациентов было ограничено возможностью привлечения носителей вируса, так как проводилось на финальной стадии эпидемии, когда регистрировалось уже незначительное число новых инфицированных пациентов.

Ранее нами были получены мышинные мАТ к рекомбинантному гликопротеину вируса геморрагической лихорадки Эбола штамма Заир без трансмембранного домена (rGPdTM), отобраны три мАТ GPE118, GPE325 и GPE534, различающиеся по эпитопной специфичности. Определены нуклеотидные и аминокислотные последовательности переменных доменов. Установлены каркасные и гипервариабельные участки тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов [8, 9].

Цель настоящей работы состояла в создании на основе мышинных мАТ полноразмерных рекомбинантных химерных антител к EBOV GP, а также в изучении их иммунохимических свойств: установлении подлинности, специфичности и иммунореактивности

полноразмерных химерных антител, определении констант диссоциации и эпитопной специфичности.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали рекомбинантный белок EBOV rGPdTM (IBT Bioservices, США); рекомбинантные белки NP и VP40 (Fitzgerald Industries International, США); мАТ 4G7 против каппа-цепи Ig человека и мАТ 2C11 против гамма-1-цепи IgG человека (Hytest, Турку, Финляндия); мАТ против EBOV GP h13F6, c13C6FR1, c6D8, KZ52 и 4F3 (IBT Bioservices, США); конъюгат ЭкстрАвидин-пероксидаза (E2886, Sigma-Aldrich, США); ТМБ-субстрат (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, «БиотестСистемы», Россия); биотинил-N-гидроксисукцинимид (H1759, Sigma-Aldrich); нитроцеллюлозную мембрану (Membrane filters, cellulose nitrate, pore size 0.45  $\mu$ m, S045A330R, Advantec MFS, Inc., США); мембрану Vivaflow 200 (Sartorius Stedim Biotech, Германия); 96-луночные планшеты с высокой связывающей способностью (Corning-Costar, Нидерланды); Tween-20.

### Конструирование системы экспрессии химерных мАТ в клетках млекопитающих

Конструирование химерных последовательностей легких (L) или тяжелых цепей (H) мАТ проводили последовательным присоединением к ДНК, кодирующей переменный домен антитела, константного домена легкой цепи человека каппа-подкласса для L-цепи либо константные домены C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>3 тяжелой цепи человека IgG1-подкласса для H-цепи. Также к перечисленным последовательностям присоединяли фрагменты ДНК, кодирующие 5'-нетранслируемую область и содержащие последовательность Козак, последовательности «родных» лидерных пептидов, обеспечивающих секрецию иммуноглобулинов в культуральную среду, 3'-нетранслируемый фрагмент ДНК, содержащий сайт полиаденилирования.

На матрице плазмид, полученных ранее [8] и кодирующих переменные домены тяжелой цепи антител GPE118, GPE534 и GPE325, с помощью ПЦР синтезировали фрагменты ДНК, содержащие последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, параллельно на 3'-конец вводили сайты узнавания рестриктаз SacI и AраI. В случае легких цепей мАТ фрагменты, составляющие единицу транскрипции, объединяли посредством ПЦР с перекрыванием амплифицируемых фрагментов (SOE-PCR), как и присоединение 5'-нетранслируемой области и лидерного пептида тяжелых цепей. Константные домены C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>3 тяжелой цепи человека IgG1-подкласса и 3'-нетранслируемой области, содержащей сайт полиаденилирования, лигировали

по Ара I-сайту, присутствующему на 5'-конце человеческого  $C_{\beta}1$ -домена и введенному на 3'-конец варибельного домена методом ПЦР. Бипромоторный (hEF1-НТЛV-промотор для тяжелой цепи и CMV-промотор для легкой цепи антитела) вектор экспрессии конструировали согласно [10].

#### Получение клеточных линий-продуцентов рекомбинантных антител

Полноразмерные рекомбинантные антитела получали в клетках CHO линии DG44. Клетки культивировали в среде CD DG44 (Invitrogen) с добавлением 8 мМ L-глутамина и 0.18% Pluronic F-68 (Invitrogen). В колбы Эрленмейера общим объемом 125 мл помещали 30 мл клеточной суспензии в концентрации  $3 \times 10^5$  клеток/мл и культивировали при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере с частотой 130 об/мин в  $CO_2$ -инкубаторе Sanyo MCO-18AIC (Sanyo, Япония) при температуре 37°C, 8%  $CO_2$  и максимальной влажности. Трансфекцию проводили через 1 сут после начала культивирования с использованием реагента Freestyle MAX (Invitrogen). Для трансфекции использовали 15 мкл Freestyle MAX и 18 мкг плазмиды, содержащей легкую и тяжелую цепи антител под контролем промоторов CMV и EF1-альфа соответственно и общий селективный маркер DHFR. Через 48 ч после трансфекции проводили селекцию культуры клеток. Для этого культуру клеток высевали в среду CD OptiCHO (Invitrogen), не содержащую нуклеотиды. Клетки высевали во флаконы Эрленмейера объемом 125 мл в 30 мл среды OptiCHO с добавлением 8 мМ L-глутамина и культивировали в условиях, описанных выше. Первый этап селекции на данной среде считали завершенным, когда жизнеспособность культуры становилась равной 95% или выше, а скорость удвоения популяции клеток – 1 сут. На следующем этапе селекции линий в ту же среду культивирования добавляли 10 нМ метотрексата (MTX). После прохождения культурой клеток данного этапа селекции начинали наработку экспериментальных образцов рекомбинантных антител.

После проведения селекции с использованием MTX для увеличения специфической продукции рекомбинантных антител и стабилизации продуцентов линии-продуценты подвергали клонированию на клеточном сортере ClonePIX FL (Genetix, Великобритания). Клеточную суспензию высевали в полную полутвердую среду CloneMedia-CHO (Genetix, Великобритания), дополненную 8 мМ L-глутамина и 10 мг/мл вторичных антител к IgG человека, меченных FITC (Genetix, Великобритания). Клоны отбирали согласно рекомендациям производителей клеточного сортировщика и культивиро-

вали на среде XP Media (Genetix, Великобритания) с добавлением 8 мМ L-глутамина. Клетки, после увеличения их количества в каждом клоне, переводили на среду CD OptiCHO (Invitrogen, США) для дальнейшего роста, криоконсервирования и проверки экспрессионных и ростовых свойств.

#### Наработка рекомбинантных антител

Культуры высевали в колбы Эрленмейера объемом 125 мл в 30 мл среды OptiCHO с добавлением L-глутамина до 8 мМ. Культивирование начинали с концентрации  $3 \times 10^5$  клеток/мл при условиях, описанных выше. Культивирование прекращали при снижении жизнеспособности культуры клеток до 50%. Кондиционированную среду (0.5 л) с подтвержденным содержанием антител, полученную после культивирования клеточной линии CHO, центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 мин, после чего фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм. Кондиционированную среду концентрировали методом тангенциальной ультрафильтрации на установке Vivaflow (Sartorius, Германия) с уровнем отсечения молекулярной массы 50 кДа. Антитела выделяли из концентрированного супернатанта с помощью аффинной хроматографии на колонках с белок А-агарозой (GE Healthcare, США) согласно рекомендациям производителя.

Содержание рекомбинантных антител в элюатах после аффинной хроматографии оценивали с помощью метода непрямого ИФА.

#### Иммуноблоттинг рекомбинантных антител с мАТ 4G7 и 2C11

Электрофоретическое разделение рекомбинантных антител (6 мкг на дорожку) проводили в 12% ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Затем осуществляли электрофоретический перенос (электроблоттинг) белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0.45 мкм (Advantec MFS, Inc., США). Мембрану блокировали раствором 5% казеина в PBS в течение ночи при 4°C и трижды промывали PBS-Т (10 мМ  $K_2HPO_4$ , pH 7.5, 0.145 М NaCl, 0.05% Tween-20). Затем мембрану разрезали на полоски и инкубировали в растворе антител (мАТ 4G7 или мАТ 2C11, 10 мкг/мл, PBS) в течение 1 ч при 37°C. После пятикратной промывки в буфере PBS-Т проводили инкубацию с конъюгатом пероксидазы хрена и антител козы против IgG мыши в разведении 1 : 15000 в течение 1 ч при 37°C. После повторной трехкратной промывки в PBS-Т добавляли субстрат (3,3-диаминобензидин, 4-хлор-1-нафтол,  $H_2O_2$ ) и инкубировали в течение 4–10 мин. Реакцию останавливали, промывая полоски водой.

### Иммуноблоттинг рекомбинантного EBOV rGPdTM с рекомбинантными антителами

После электрофоретического разделения EBOV rGPdTM (12 мкг) в 12% ПААГ в восстанавливающих условиях, электроблоттинга белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану и блокировки по методике, описанной выше, перенесенные белки выявляли на нитроцеллюлозной мембране с помощью непрямого ИФА (иммуноблоттинг). Для этого мембрану разрезали на полоски, помещали в раствор рекомбинантных антител GPE118, GPE325, GPE534 с концентрацией 10 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После инкубации полоски выдерживали с конъюгатом МАТ 4G7-пероксидаза хрена в течение 1 ч при 37°C в разведении 1 : 25000. Последнюю отмывку и проявление реакции проводили как описано выше.

### Непрямой ИФА с иммобилизованными рекомбинантными белками вируса Эбола rGPdTM, NP и VP40

В лунки 96-луночного планшета с высокой связывающей способностью сорбировали антиген (1 мкг/мл, PBS) при 4°C в течение ночи. Планшеты 5 раз промывали PBS с 0.05% Tween-20. Затем вносили раствор исследуемых рекомбинантных антител (PBS, 2% BSA) серией трехкратных разведений, начиная с концентрации 3 мкг/мл, инкубировали 1 ч при 37°C, промывали 5 раз PBS, 0.05% Tween-20. Инкубировали с конъюгатом МАТ 4G7-пероксидаза хрена против каппа-цепи Ig человека в рабочем разведении 1 : 50000 (PBS, 2% BSA) в течение 1 ч при 37°C. Для проявления реакции лунки промывали 5 раз PBS, 0.05% Tween-20, вносили по 100 мкл ТМВ-субстрата, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре на шейкере. Реакцию останавливали 0.5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и измеряли поглощение при длине волны 450 нм.

### Определение $K_d$ комплекса рекомбинантных антител и EBOV GP

На первом этапе рекомбинантные антитела в постоянной концентрации 7 пМ (1 нг/мл) инкубировали с антигеном EBOV GP в диапазоне концентраций 0.1–10 нМ (10–1000 нг/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре с постоянным перемешиванием для достижения термодинамического равновесия в трехкомпонентной системе: свободный антиген, свободное антитело и комплекс антиген-антитело. На втором этапе концентрацию свободных рекомбинантных антител измеряли методом твердофазного ИФА с иммобилизованным на планшет EBOV GP. На заключительном этапе рассчитывали  $K_d$  по уравнению Клотца с использованием значений общей

концентрации антигена и концентрации свободных рекомбинантных антител [11].

### Конкурентный ИФА для эпитопного картирования рекомбинантных химерных антител

Исходные МАТ мыши, контрольные коммерческие МАТ и изучаемые полноразмерные химерные антитела в концентрации 5 мкг/мл сорбировали при 4°C в течение ночи в PBS, pH 7.2 в лунки 96-луночных планшетов с высокой связывающей способностью (по 100 мкл в лунку). Планшет промывали 5 раз PBS-T (200 мкл в лунку). Контрольные МАТ KZ52, h13F6, c13C6FR1, c6D8, 4F3 титровали, начиная с концентрации 6 мкг/мл, трехкратными серийными разведениями в PBS-T (0.01 М KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 М NaCl, 0.2% BSA, 0.1% Tween-20), 50 мкл в лунку. Рекомбинантный вирусный белок биотинилировали с использованием пятикратного избытка NHS-эфира биотина ((+)-Biotin N-hydroxysuccinimide ester, H1759 Sigma). Биотинилированный EBOV rGPdTM в концентрации 800 нг/мл в PBS-T вносили по 50 мкл в лунку. Инкубировали в течение 1 ч при 37°C с перемешиванием. Планшет промывали 5 раз PBS-T (по 200 мкл в лунку). Конъюгат ЭкстраАвидин-пероксидаза в концентрации 500 нг/мл вносили в каждую лунку в объеме 100 мкл и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Планшет промывали 5 раз PBS-T по 200 мкл в лунку. В каждую лунку добавляли по 100 мкл ТМВ-субстрата, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре на шейкере. Реакцию останавливали, добавляя 0.5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> по 100 мкл в лунку. Поглощение измеряли при длине волны 450 нм.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантные антитела получали, используя линию клеток яичника китайского хомячка CHO DG44 с дефицитом гена дигидрофолатредуктазы, растущую в виде суспензии. С этой целью предварительно конструировали систему экспрессии и получали клеточные линии-продуценты рекомбинантных антител. В качестве системы экспрессии в эукариотических клеточных линиях использовали бипромоторную систему [10] на основе коммерческого вектора рOptiVEC-ТОРО, содержащего цитомегаловирусный промотор (CMV) и гибридный промотор hEF1-HTLV для трансляции клонированных генов, а также ген устойчивости к генетицину. Вектор также содержит ген дигидрофолатредуктазы (ДФР), уровень экспрессии которой регулируется CMV-промотором через независимый сайт связывания рибосом IRES. ДФР при условии коэкспрессии целевого гена антител может быть использована в качестве селективного маркера в процессе создания стабиль-

ной клеточной линии. Экспрессия ДГФР позволяет нейтрализовать эффект присутствия потенциально вредного для клеток метотрексата (МТХ) и поддерживать тем самым клеточную пролиферацию. При этом при повышении концентрации МТХ происходит амплификация гена ДГФР, в свою очередь, способствующая увеличению числа копий генов антител. При селективном давлении метотрексатом геномная амплификация генов тяжелой и легкой цепей происходит синхронно. Для каждого из антител были получены соответствующие бипромоторные конструкции, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь каппа-изотипа и тяжелую цепь IgG1-изотипа.

Полученные клеточные линии СНО использовали для наработки рекомбинантных антител в режиме суспензионного культивирования в бессывороточной среде. Качество экспериментальных образцов рекомбинантных антител анти-Эбола контролировали электрофоретическим и хроматографическим методами.

Подлинность полученных антител подтверждали в формате иммуноблотинга моноклональные антитела, специфичные к характерным участкам тяжелой и легкой цепей, – мышинные МАТ 4G7 против капсацепи Ig человека и МАТ 2C11 против гамма-1-цепи IgG человека. Иммуноблотинг проводили в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях. Результаты приведены на рис. 1.

Результаты иммуноблотинга свидетельствуют о том, что все препараты рекомбинантных химерных антител в невосстанавливающих условиях имеют ос-

новную полосу, соответствующую по подвижности молекулярной массе около 150 кДа и практически одинаково окрашиваются МАТ 4G7 и 2C11, что соответствует составу и ожидаемой молекулярной массе молекулы IgG. Все образцы антител также имеют три-четыре дополнительных минорных полосы, которые окрашиваются обоими МАТ и содержат фрагменты тяжелой и легкой цепей, что указывает на возможную протеолитическую деградацию антител, неполную сборку (отсутствие замыкания дисульфидных связей в шарнирной области), наличие свободных легких цепей. В восстанавливающих условиях антитело 4G7 окрашивает исключительно свободную легкую цепь изотипа каппа с электрофоретической подвижностью на уровне 25 кДа. Антитело 2C11 против тяжелой цепи IgG1 человека в восстанавливающих условиях не окрашивает полос в образцах антител, что указывает на зависимость связывания этого антитела от замыкания внутрицепочечных дисульфидных связей в исследуемых антителах. Подвижность и характер окрашивания полос, выявленные с помощью иммуноблотинга с использованием антител 2C11 и 4G7, однозначно доказывают подлинность образцов рекомбинантных полноразмерных антител GPE118, GPE325 и GPE534 против EBOV GP.

Иммунореактивность рекомбинантных химерных IgG против EBOV GP определяли методом непрямого ИФА с иммобилизованными вирусными белками EBOV rGPdTM, NP и VP40 (рис. 2).

Результаты непрямого ИФА полноразмерных химерных антител с иммобилизованными структурны-

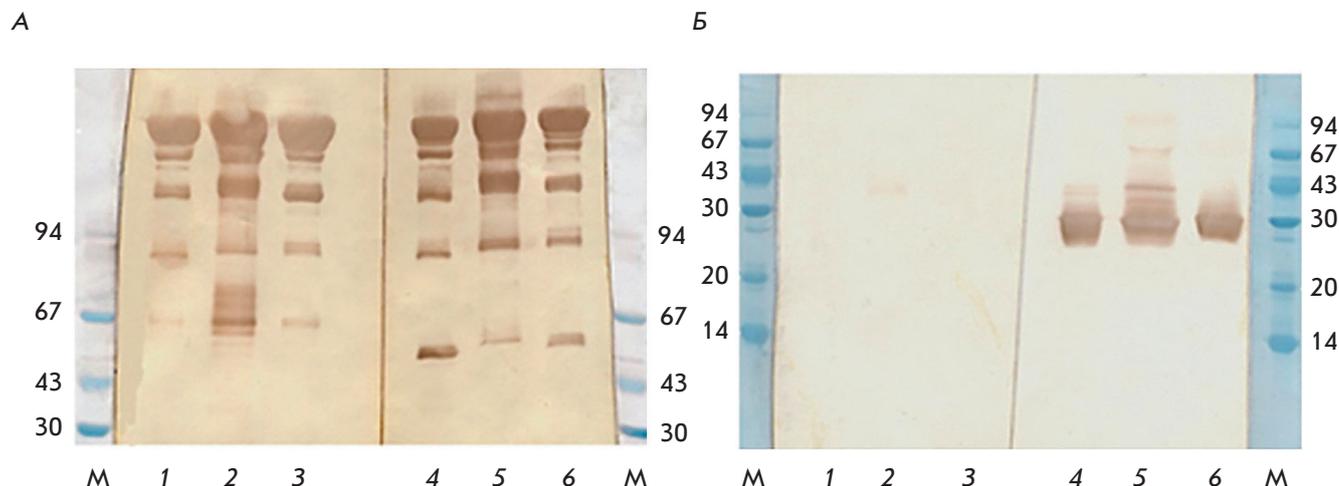


Рис. 1. Иммуноблотинг рекомбинантных химерных антител в невосстанавливающих (А) и восстанавливающих (Б) условиях после 7% SDS-ПААГ с конъюгатами на основе МАТ 2С11 (1–3) и МАТ 4G7 (4–6). 1, 4 – GPE118, 2, 5 – GPE325, 3, 6 – GPE534. М – стандарты молекулярной массы, кДа

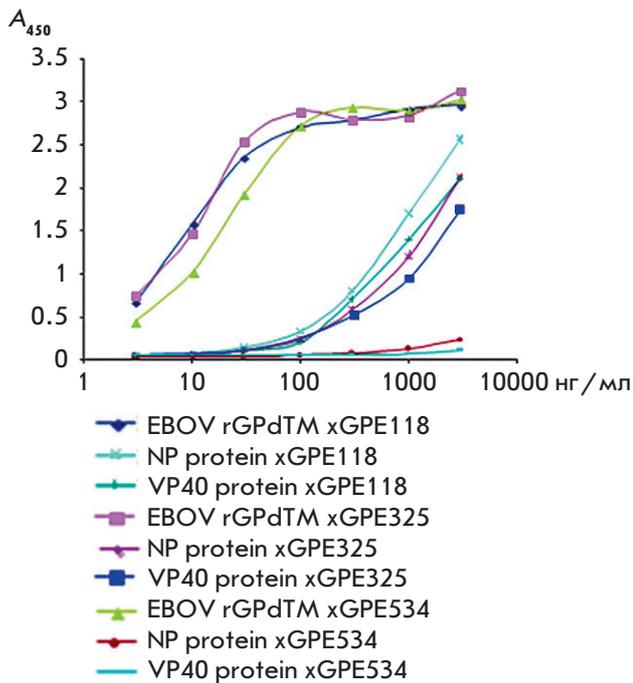


Рис. 2. Кривые титрования полноразмерных химерных антител в непрямом ИФА (ОД = 450 нм) с иммобилизованными белками EBOV rGPdTM, NP и VP40. xGPE118, xGPE325, xGPE534 – химерные рекомбинантные антитела к rGPdTM, NP – нуклеопротеин, VP40 – структурный белок, rGPdTM – гликопротеин вируса Эбола

ми белками EBOV rGPdTM, NP и VP40 показывают, что все антитела направлены исключительно против вирусного гликопротеина.

Иммунореактивность (определение конечной точки кривой титрования, end point titer – ЕРТ) полноразмерных химерных антител оценивали методом непрямого ИФА с сорбцией EBOV rGPdTM на твердую фазу. Результаты титрования (рис. 3) полноразмерных химерных антител в непрямом ИФА с иммобилизованным EBOV rGPdTM свидетельствуют о высокой аффинности экспериментальных образцов к целевому белку: ЕРТ для xGPE118, xGPE325 и xGPE534 соответствует концентрации 0.3 нг/мл (2 пМ).

Специфичность трех экспериментальных образцов рекомбинантных полноразмерных химерных антител против EBOV GP анализировали методом иммуноблоттинга (рис. 4) с рекомбинантным EBOV rGPdTM, который представляет собой внеклеточную часть вирусного гликопротеина с удаленным трансмембранным доменом, экспрессированную в клетках насекомых и имеющую природный характер гликозилирования.

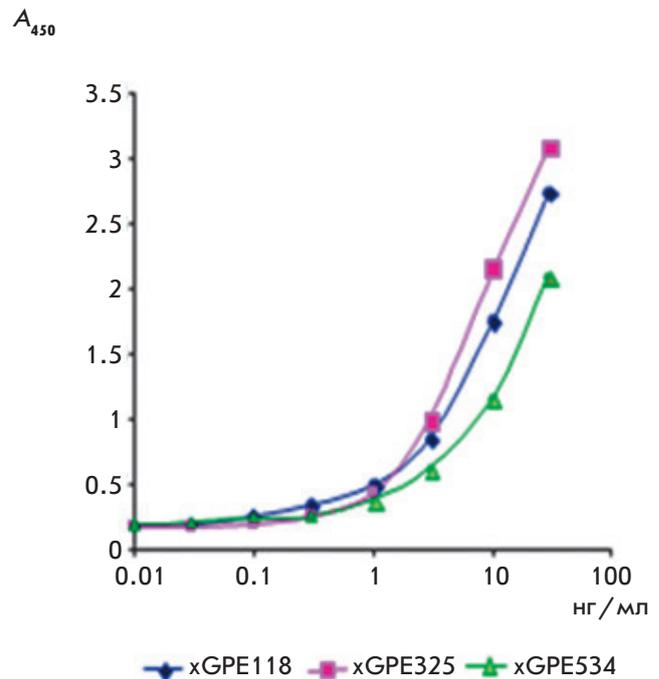
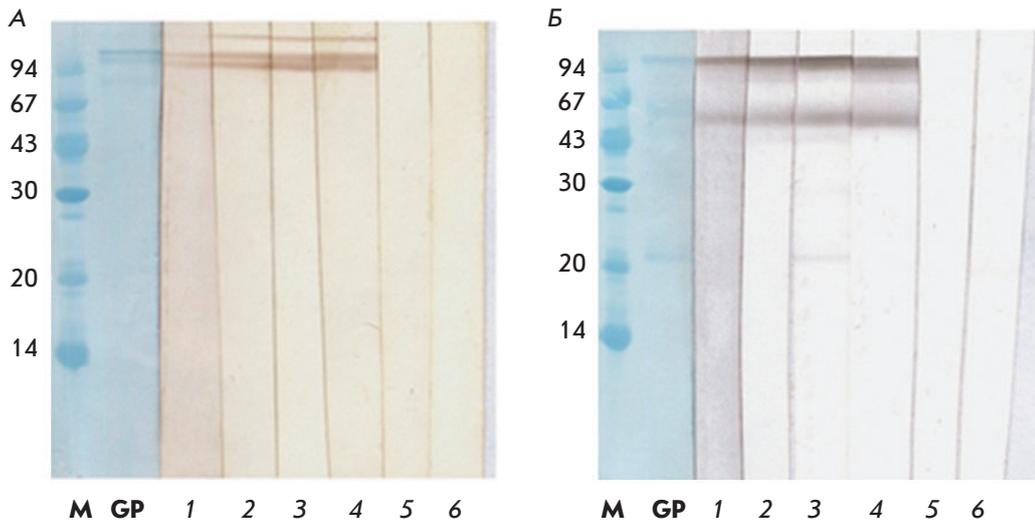


Рис. 3. Зависимость поглощения при 450 нм от концентрации полноразмерных химерных антител в непрямом ИФА с иммобилизованным EBOV rGPdTM. xGPE118, xGPE325, xGPE534 – химерные рекомбинантные антитела к rGPdTM

Результаты иммуноблоттинга показывают, что рекомбинантные полноразмерные антитела GPE118, GPE325 и GPE534 в невозстанавливающих условиях окрашивают одну мажорную полосу с молекулярной массой около 95 кДа, что соответствует полноразмерному гликопротеину GP. В восстанавливающих условиях эти антитела окрашивают две полосы, соответствующие субъединицам GP1 и GP2, что однозначно доказывает специфичность полученных антител по отношению к EBOV rGPdTM.

Значения констант диссоциации комплекса антиген-антитело определяли в координатах Клотца по методу Фриге [11]. В табл. 1 приведено сравнение констант диссоциации исходных МАТ мыши [9] и рекомбинантных полноразмерных химерных антител, полученных нами.

Сравнение аффинностей исходных МАТ мыши и рекомбинантных химерных антител свидетельствует о неизменности этого параметра при переходе от природных полноразмерных МАТ к рекомбинантным полноразмерным химерным антителам, несмотря на модификацию константных частей антител, что указывает на корректное определение аминокис-



**Рис. 4.** Иммуноблоттинг рекомбинантных химерных антител против EBOV GP после 12% SDS-ПААГ в невозстанавливающих (А) и восстанавливающих (Б) условиях. После переноса на мембрану каждую полоску инкубировали с отдельным антителом. 1 – GPE118, 2 – GPE325, 3 – GPE534, 4 – мАТ с6D8 (положительный контроль), 5 – h13F6 (отрицательный контроль), дорожка 6 – Fl6v3, М – стандарты молекулярной массы, кДа

лотных последовательностей мАТ мыши и правильный фолдинг рекомбинантных белков в выбранной системе экспрессии. Следует отметить, что аффинность антитела xGPE325 IgG1-изотипа была даже несколько выше, чем у родительских мышинных мАТ IgM-изотипа.

Полноразмерные рекомбинантные антитела использовали для проведения эпитопного картирования методами конкурентного ИФА с использованием коммерческих антител с известной эпитопной специфичностью (табл. 2). Этот анализ необходим для теоретической оценки возможной протективной активности. Для подтверждения правильного выбора трех и более моноклональных антител против EBOV GP, в первую очередь, требуется показать, что мАТ связываются или взаимодействуют с тремя неперекрывающимися эпитопами GP, и эти эпитопы близки к эпитопам известных нейтрализующих антител.

При проведении твердофазного конкурентного ИФА с использованием мономерного антигена биотинилированного EBOV rGPdTM исследуемое антитело захвата иммобилизовали на твердую фазу, затем одновременно добавляли биотинилированный антиген и контрольное мАТ с известной эпитопной специфичностью. Если каждое мАТ в паре направлено против разных (неперекрывающихся) сайтов узнавания (эпитопов), то образуется тройной комплекс: антитело захвата–антиген–контрольное мАТ; если оба антитела направлены против одного эпитопа, то тройной комплекс на твердой фазе не образуется.

Каждое из коммерческих антител иммобилизовали на твердую фазу. Конкурентный ИФА проводили с использованием рекомбинантных химерных антител GPE118, GPE325, GPE534, а также коммерческих антител с известной эпитопной специфичностью [12].

**Таблица 1.** Сравнение  $K_d$  для исходных мАТ мыши и полноразмерных химерных антител

Образец	Субизотипы	$K_d$ , нМ
GPE118	IgG1-каппа, мышь	1.7–2.0
xGPE118	IgG1-каппа, человек	2.5–4.0
GPE325	IgM-каппа, мышь	1.8–3.4
xGPE325	IgG1-каппа, человек	1.2–2.5
GPE534	IgG2b-каппа, мышь	0.8–1.0
xGPE534	IgG1-каппа, человек	1.3–1.9

**Примечание.** xGPE118, xGPE325, xGPE534 – химерные рекомбинантные антитела к rGPdTM.

Результаты конкурентного ИФА для полученных нами рекомбинантных полноразмерных химерных и коммерческих антител при связывании с биотинилированным EBOV rGPdTM позволяют качественно охарактеризовать эпитопы экспериментальных антител. Антитело GPE534 конкурирует с нейтрализующим антителом KZ52, антитела GPE118, GPE325, GPE534 достаточно сильно, хотя и в разной степени, конкурируют с нейтрализующим антителом h13F6. Антитела GPE118 и GPE534 весьма слабо конкурируют с нейтрализующим антителом c13C6 и слабо конкурируют с нейтрализующим антителом с6D8. Ни одно из экспериментальных антител не конкурирует с ненейтрализующим мышинным мАТ 4F3. Данные конкурентного ИФА (не приведены) позволяют рассчитать коэффициент ингибирования (КИ) связывания рекомбинантных полноразмерных антител с биотинилированным EBOV rGPdTM в присутствии контрольных коммерческих антител в разных концентрациях (табл. 3). КИ представляет собой от-

Таблица 2. Свойства коммерческих антител против EBOV GP

Антитело	Видовая принадлежность	Эпитоп	Полипептид	Компонент коктейля антител	Нейтрализующая активность	Ссылка
KZ52	Человек	конформационный	GP1-GP2	нет	+	[11]
h13F6	Мышь/человек	404-412	GP1	MB-003	+	[4]
c13C6FR1	Мышь/человек	33-295	GP1	MB-003, ZMapp	+	[4, 5]
c6D8	Мышь/человек	393-401	GP1	MB-003	+	[4]
4F3	Мышь	н/д		нет	-	

Таблица 3. Коэффициент ингибирования экспериментальных образцов полноразмерных антител GPE118, GPE325 и GPE534 контрольными мАТ по данным конкурентного ИФА с биотинилированным EBOV rGPdTM

Контрольные мАТ	КИ контр. мАТ	GPE118 IgG/Fab*/мАТ	GPE325 IgG/Fab*/мАТ	GPE534 IgG/Fab*/мАТ	Эпитоп, а.о.	Полипептид
h13F6	0.39	0.35/0.69/0.31	0.41/0.57/0.30	0.96/1.00/0.97	404-412	GP1
c13C6FR1	0.20	0.86/0.93/0.94	1.13/0.94/1.18	0.96/1.01/0.88	33-295	GP1
c6D8	0.39	0.76/0.99/0.77	0.60/0.64/0.70	0.67/0.99/0.97	393-401	GP1
KZ52	0.17	1.09/1.02/1.03	1.04/1.10/1.11	0.63/0.92/0.86	Конф.	GP1-GP2
4F3	0.43	1.05/0.90/1.23	1.31/1.10/1.44	1.0/0.87/0.96	н.д.	н.д.

\* Из данных работы [13].

Примечание. контр. мАТ – контрольные мАТ; IgG – химерные полноразмерные антитела; конф. – конформационный; н.д. – нет данных.

ношение поглощения в конкурентном ИФА при концентрации контрольного мАТ 3 мкг/мл и отсутствии контрольного мАТ. При значениях КИ, больших или равных 1, конкуренция между контрольным мАТ и исследуемыми полноразмерными антителами отсутствует, т.е. антитела направлены против разных эпитопов. Если КИ меньше 1, то контрольное мАТ и исследуемые полноразмерные антитела взаимодействуют с одним и тем же или близко расположенными эпитопами. Чем меньше значение КИ, тем ближе расположены эпитопы.

Анализ значений КИ позволяет сделать вывод о совпадении эпитопов рекомбинантных полноразмерных антител GPE118, GPE325 и GPE534, химерных Fab-фрагментов [13] и исходных мышинных мАТ. Также все три кандидатных антитела против EBOV GP действительно направлены против разных эпитопов. Ни одно из них не конкурирует с нейтрализующим мАТ 4F3. Эпитоп антител GPE118 и GPE325 перекрывается с эпитопом мАТ h13F6, локализованным в муциновом домене GP между аминокислотными остатками 404-412 субъединицы GP1 гликопротеина,

причем GPE118 конкурирует за связывание с антигеном сильнее, чем антитело h13F6 само с собой. Эпитоп антитела GPE325 перекрывается с эпитопом мАТ c6D8, локализованным между аминокислотными остатками 393-401 субъединицы GP1, и немного смещен в направлении N-конца субъединицы GP1 относительно эпитопа GPE118. Эпитоп GPE534, который по данным иммуноблотинга имеет линейную природу, расположен вблизи конформационного эпитопа мАТ KZ52, в формировании которого принимают участие многочисленные аминокислотные остатки субъединиц GP1 и GP2 вирусного гликопротеина. Таким образом, все три полноразмерных химерных антитела против EBOV GP имеют эпитопы, совпадающие или перекрывающиеся с эпитопами трех хорошо исследованных нейтрализующих мАТ против вируса Эбола.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено конструирование и осуществлена наработка в клетках CHO рекомбинантных полноразмерных химерных антител GPE118, GPE325 и GPE534

к гликопротеину вируса Эбола. Иммунохимические свойства рекомбинантных химерных полноразмерных антител изучены методами иммуноблоттинга, непрямого, прямого и конкурентного ИФА с использованием рекомбинантных белков EBOV rGPdTM, NP и VP40. Подлинность рекомбинантных химерных полноразмерных антител изотипа IgG1 доказана методом иммуноблоттинга с применением мАТ 4G7 против легкой цепи каппа Ig человека и мАТ 2C11 против тяжелой цепи IgG1 человека, а также их специфичность по отношению к EBOV GP. Результаты непрямого ИФА свидетельствуют об отсутствии перекрестного иммунологического взаимодействия с белками NP и VP40 вируса Эбола. Аффинность полноразмерных антител указывает на высокое сродство экспериментальных образцов к EBOV GP.

Анализ значений коэффициента ингибирования, полученных в результате конкурентного ИФА с использованием панели коммерческих нейтрализую-

щих антител, позволяет сделать вывод о том, что все исследуемые антитела направлены против разных участков гликопротеина. При этом эпитопы рекомбинантных антител совпадают или частично перекрываются с эпитопами трех коммерческих нейтрализующих антител против вируса Эбола. Этот результат свидетельствует о потенциально высокой нейтрализующей активности полученных рекомбинантных антител. ●

*Работа выполнена с использованием средств субсидии (соглашение № 14.607.21.0096), выделяемой Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (уникальный идентификатор проекта – RFMEFI60714X0096).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Geisbert T.W., Young H.A., Jahrling P.B., Davis K.J., Kagan E., Hensley L.E. // J. Infect. Dis. 2003. V. 188. № 11. P. 1618–1629.
2. Warren T.K., Warfield K.L., Wells J., Swenson D.L., Donner K.S., van Tongeren S.A., Garza N.L., Dong L., Mourich D.V., Crumley S., et al. // Nat. Med. 2010. V. 16. № 9. P. 991–994.
3. Oswald W.B., Geisbert T.W., Davis K.J., Geisbert J.B., Sullivan N.J., Jahrling P.B., Parren P.W., Burton D.R. // PLoS Pathog. 2007. V. 3. № 1. e9.
4. Olinger G.G. Jr., Pettitt J., Do Kim, Working C., Bohorov O., Bratcher B., Hiatt E., Hume S., Johnson A., Morton J., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. № 44. P. 18030–18035.
5. Corti D., Misasi J., Mulangu S., Stanley D.A., Kanekiyo M., Wollen S., Ploquin A., Doria-Rose N.A., Staube R.P., Bailey M., et al. // Science. 2016. V. 351. № 6279. P. 1339–1342.
6. Qiu X., Wong G., Audet J., Bello A., Fernando L., Alimonti J.B., Fausther-Bovendo H., Wei H., Aviles J., Hiatt E., et al. // Nature. 2014. V. 514. № 7520. P. 47–53.
7. PREVAIL II Writing Group.; Multi-National PREVAIL II Study Team, Davey R.T. Jr., Dodd L., Proschan M.A., Neaton J., Neuhaus Nordwall J., Koopmeiners J.S., Beigel J., Tierney J., Lane H.C., Fauci A.S., et al. // N. Engl. J. Med. 2016. V. 375. № 15. P. 1448–1456.
8. Панина А.А., Алиев Т.К., Шемчукова О.Б., Дементьева И.Г., Варламов Н.Е., Позднякова Л.П., Боков М.Н., Долгих Д.А., Свешников П.Г., Кирпичников М.П. // ДАН. 2016. Т. 467. № 4. С. 477.
9. Шемчукова О.Б., Дементьева И.Г., Варламов Н.Е., Позднякова Л.П., Боков М.Н., Алиев Т.К., Панина А.А., Долгих Д.А., Кирпичников М.П., Свешников П.Г. // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2016. № 1. С. 29–34.
10. Балабашин Д.С., Алиев Т.К., Топорова В.А., Панина А.А., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Патент РФ на изобретение № 2555533.
11. Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E. // J. Immunol. Meth. 1985. V. 77. № 2. P. 305–319.
12. Lee J.E., Fusco M.L., Hessel A.J., Oswald W.B., Burton D.R., Saphire E.O. // Nature. 2008. V. 454. P. 177–182.
13. Панина А.А., Дементьева И.Г., Алиев Т.К., Топорова В.А., Боков М.Н., Позднякова Л.П., Шемчукова О.Б., Долгих Д.А., Свешников П.Г., Кирпичников М.П. // Биоорг. химия. 2017. Т. 43. № 4. С. 389–401.