

УДК 612.017.1:616-097

Наноантитела – потенциальный терапевтический препарат против лихорадки Эбола

И. Б. Есмагамбетов¹, Д. В. Щебляков¹, Д. А. Егорова¹, О. Л. Воронина¹, А. А. Деркаев¹, Д. В. Воронина¹, О. Попова¹, Е. И. Рябова¹, Д. Н. Щербинин¹, Е. И. Аксенова¹, А. Н. Семенов¹, М. С. Кунда¹, Н. Н. Рыжова¹, О. В. Зубкова¹, А. И. Тухватулин¹, Д. Ю. Логунов¹, Б. С. Народицкий¹, С. В. Борисевич², А. Л. Гинцбург¹

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

²«48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад, 141306, Россия

*E-mail: esmagambetovib@gmail.com

Поступила в редакцию 18.06.2021

Принята к печати 14.07.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11487

РЕФЕРАТ Лихорадка Эбола – высококонтагиозное вирусное заболевание, при котором смертность достигает 90%. В настоящее время в мире не существует зарегистрированных средств специфической терапии заболевания, вызываемого вирусом Эбола. Однако в качестве перспективных противовирусных препаратов рассматриваются моноклональные антитела, обладающие высокой специфичностью к поверхностному гликопротеину вируса Эбола (EBOV GP). За последнее десятилетие широкое применение в диагностике и терапии различных инфекционных и неинфекционных заболеваний получили наноантитела (однодоменные антитела, неканонические антитела семейства верблюдовых). В настоящей работе при помощи иммунизации альпака (*Vicugna pacos*) рекомбинантным аденовирусом человека 5-го серотипа, экспрессирующим ген EBOV GP (Ad5-GP), впервые получена панель наноантител, специфичных к EBOV GP. Наиболее перспективный клон наноантитела аЕv6 был выбран для дальнейшего изучения на основе данных по специфической активности, констант аффинности и вируснейтрализующей активности в отношении рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного EBOV GP (rVSV-GP). С целью улучшения фармакокинетических и иммунологических свойств клон аЕv6 был модифицирован Fc-фрагментом человеческого IgG1 (аЕv6-Fc). Для оценки протективной активности химерной молекулы аЕv6-Fc разработана летальная модель инфекции мышей rVSV-GP при помощи иммуносупрессии. Испытания на летальной модели продемонстрировали защитные свойства наноантитела аЕv6-Fc. Таким образом, полученное нами наноантитело и его модификация обладают потенциальными защитными свойствами против вируса лихорадки Эбола.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирус лихорадки Эбола, наноантитела, рекомбинантный аденовирусный вектор, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БВВЭ – болезнь, вызванная вирусом Эбола; БОЕ – бляшкообразующая единица; ИФА – иммуноферментный анализ; ТМБ – тетраметилбензидин; ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер с полисорбатом 20; HRP – пероксидаза хрена; РВМС – мононуклеарные клетки периферической крови; PRNT50 – 50% вируснейтрализующая доза антитела.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус лихорадки Эбола, относящийся к семейству Filoviridae, роду *Ebolavirus*, вызывает геморрагическую лихорадку у людей и нечеловеческих приматов [1]. Род *Ebolavirus* состоит из шести видов: Заир эболавирус (EBOV), Судан эболавирус (SUDV), Бундибуге

эболавирус (BDBV), эболавирус Тайского леса (TAFV), Рестон эболавирус (RESTV) и Бомбали эболавирус (BOMV) [2]. Болезнь, вызванная вирусом Эбола (БВВЭ), сопровождается 60–90% летальностью [3, 4]. Последние вспышки БВВЭ зарегистрированы в Конго (2018 г.), Уганде (2019 г.), в Конго и Гвинее (2021 г.) [5].

Коктейли из моноклональных антител, специфичных к EBOV GP, могут обеспечить полную защиту нечеловеческих приматов от БВВЭ, и некоторые из них (Zmapp, MAb114, REGN-EB3 и GamEMab) в настоящее время проходят клинические испытания [6–8]. В предыдущем исследовании [9] с помощью иммунизации мышей Ad5-GP (компонент B вакцины ГамЭвак Комби [10]) нам удалось получить два моноклональных антитела мыши (2с8 и 6g3), способных защищать от БВВЭ.

Помимо моноклональных антител, в последние 20 лет интерес вызывает возможность применения наноантител (неканонические формы моноклональных антител семейства Верблюдовых), а также их модификаций в терапии инфекционных заболеваний [11, 12]. Однако существует лишь несколько исследований, направленных на разработку препаратов для лечения БВВЭ на основе наноантител [13–15]. Основные преимущества наноантител – относительная простая технология получения, а также способность связываться с труднодоступными антигенными эпитопами [13–15]. В то же время недостатки наноантител связаны с их быстрым выведением почками и отсутствием самостоятельной эффекторной функции у Fc-фрагмента. Для улучшения фармакокинетических и эффекторных свойств наноантител [12], а также для увеличения их авидности за счет димеризации молекулы необходима модификация Fc-фрагментом IgG.

Нами получено наноантитело, обладающее протективной активностью в отношении рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного гликопротеином вируса Эбола (rVSV-GP). С этой целью мы использовали технологию, включающую: (1) иммунизацию альпака Ad5-GP; (2) получение панели наноантител, специфичных к гликопротеину вируса Эбола (EBOV GP); (3) отбор клона с оптимальной активностью *in vitro*; (4) модификацию выбранного клона для улучшения его фармакокинетических и иммунологических свойств; (5) оценку защитной активности выбранного клона *in vivo*.

В результате работы нами отобран и охарактеризован наиболее перспективный клон наноантитела – аЕv6. Протективность модифицированной формы этого клона (аЕv6-Fc) оценивали на модели летальной инфекции иммуносупрессивных мышей rVSV-GP. Для создания иммуносупрессии мышам вводили дексаметазон и циклофосфамид. Такой подход использовали ранее [16, 17] для оценки активности противовирусных препаратов, а также для изучения факторов патогенеза вируса лихорадки Эбола. В нашем исследовании показана способность антитела аЕv6-Fc защищать мышей от летальной инфекции

rVSV-GP, что может говорить о его потенциальной противовирусной активности в отношении вируса Эбола.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вирусы и антигены

Ad5-GP – рекомбинантный дефектный по репликации аденовирус, полученный, как описано ранее [10, 18], и экспрессирующий ген GP Zaire ebolavirus (изолят *Ebola virus/H. sapiens-wt/SLE/2014/Makona-G3735.1*, GenBank Accession Number KM233056).

rVSV-GP – рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, полученный, как описано ранее [10], и экспрессирующий ген GP Zaire ebolavirus (изолят *Ebola virus/H. sapiens-wt/SLE/2014/Makona-G3735.1*, GenBank Accession Number KM233056).

Рекомбинантный белок GP Zaire ebolavirus (штамм *H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*) – Sino Biological, Китай, кат. № 40442-V02H.

Фар-помощник M13 Hyperphage M13 K07ΔpIII – Progen, Германия, кат. № PRHYPE.

Клеточные линии

Клеточная линия CHO-S – Thermo Fisher Scientific, США, кат. № R80007.

Клеточные линии Vero E6 (ATCC CRL 1586) и GMK-AN-1(D) (CVCL_L878) получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Санкт-Петербург, Россия, <https://www.incras.ru/institut/struktura/ckp/rossijskaja-kollekcija-kletochnyh-kultur/>).

Иммунизация альпака, получение иммунной библиотеки, экспрессия и очистка наноантител

Здорового 4-летнего самца альпака (*Vicugna pacos*) использовали для иммунизации и дальнейшего отбора крови. Животное предоставлено фермой «Российские Альпаки» (Походкино, Россия).

Ad5-GP (10⁸ БОЕ) вводили внутримышечно, трехкратно, с трехнедельными интервалами, без адъювантов. Рекомбинантный белок EBOV GP (200 мкг) вводили внутримышечно спустя 3 недели после последней инъекции Ad5-GP вместе с неполным адъювантом Фрейнда.

Отбор крови (150 мл) проводили спустя 5 дней после последней иммунизации, образцы крови помещали в стерильные вакуумные пробирки с гепарином лития.

Выделение мРНК, ПЦР, конструирование библиотеки и специфический скрининг выполняли согласно [19] с использованием рекомбинантного белка EBOV GP в качестве антигена.

Экспрессию и очистку наноантител осуществляли как описано ранее [19].

Секвенирование генов наноантител методом NGS

Ампликоны генов наноантител получали с помощью специальных праймеров [19] и очищали набором MinElute PCR Purification Kit (QiaGen, Нидерланды). Библиотеки готовили по протоколу для случайных фрагментов (Roche, Швейцария). Размер и качество библиотек контролировали с помощью набора Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent, США). Секвенирование выполняли с использованием набора GS Junior Titanium Sequencing Kit и GS Junior + Series XL + Kit GS Junior + Series XL (Roche) в соответствии с рекомендациями производителя.

Полную обработку ампликонов проводили с помощью программного обеспечения 454 Sequencing System Software v.3.0 и собственных программ.

Измерение констант аффинности наноантител

Константы аффинности наноантител определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе Biacore 3000 (GE Healthcare BioSciences AB, Швеция) как описано ранее [19] с рекомбинантным белком EBOV GP.

Получение модифицированной формы аЕv6-Fc

Нуклеотидную последовательность гена *aEv6-Fc*, синтезированную в ЗАО «Евроген» (Россия), клонировали в плазмиду pShuttle-CMV (Stratagene, США) и получили таким образом плазмиду pShuttle-CMV-aEv6Fc.

Культуру клеток CHO-S (Thermo Fisher Scientific) транзистентно трансфицировали плазмидой pShuttle-CMV-aEv6Fc с использованием системы CHO Gro (Mirus Bio, США) в соответствии с протоколом производителя. Клетки культивировали в колбах Эрленмейера при 125 об/мин, 5% CO₂, 80% влажности, 37°C, спустя 24 ч снижали температуру до 32°C и продолжали культивировать в течение 10 дней. Начиная с 3-го дня добавляли подпитки Cell boosts 7a (2%), 7b (0.2%) (HyClone, США) и 0.5% CHO Bioreactor Feed (Sigma, США) 1 раз в день. По истечении 10 дней культивирования культуральную жидкость осветляли центрифугированием при 5000 g. Антитело очищали аффинной хроматографией на системе AKTA start (Cytiva, Швеция), используя колонки MAbSelect SuRe 1 мл (Cytiva, Швеция) в соответствии с протоколом производителя. Дополнительную очистку и замену буфера проводили на колонке XK 26/100 (Cytiva) с сорбентом Superdex 200 pg (Cytiva).

Получение контрольного антитела MAb114

Для получения контрольного антитела MAb114 использовали аминокислотную последовательность,

опубликованную Corti и соавт. [7]. Нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепь антитела MAb114, синтезировали в ЗАО «Евроген», клонировали в плазмиду pShuttle-CMV (Stratagene). Полученными плазмидами pShuttle-CMV-Mab114HC и pShuttle-CMV-Mab114LC трансфицировали клеточную линию CHO-S. Процедуры трансфекции клеток и очистки антитела проводили как описано в предыдущем пункте.

Непрямой ИФА

Непрямой ИФА проводили согласно [9]. Конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) антитела – anti-human IgG (Sigma, cat. no A8667), anti-Myc-tag (Abcam, 1326) и anti-Llama IgG (Bethyl, A160-100P), использовали для обнаружения наноантител и антител (aEv6-Fc и MAb114) в сыворотке альпака соответственно.

Реакция нейтрализации вируса

Реакцию нейтрализации вируса проводили согласно [9], используя модель инфекции клеток Vero E6 вирусом rVSV-GP.

Изучение фармакокинетики аЕv6-Fc

Трем интактным макакам резусам (*Macaca mulatta*), полученным из НИИ медицинской приматологии (Веселое, Россия), внутривенно вводили 10 мг/кг аЕv6-Fc со скоростью инфузии 10 мл/ч. Образцы крови отбирали до инфузии и спустя 1, 4, 8, 16, 24, 48, 96 ч и через 7, 14, 21 дней после инфузии. Концентрацию аЕv6-Fc в крови оценивали методом непрямого ИФА с использованием различных разведений аЕv6-Fc в качестве стандартов. Фармакокинетические параметры рассчитывали с использованием программы Microsoft Excel и PKSolver softs.

Пассивная иммунизация и оценка протективной активности

Самки мышей BALB/c (возраст 4–6 недель, вес 18–20 г) предоставлены Пущинским филиалом Института биоорганической химии РАН (Пущино, Россия). Мышам для иммуносупрессии вводили дексаметазон (1 раз в день внутривенная инъекция 10 мг/кг/день за 10 дней до инъекции вируса) [17] и циклофосфамид (однократная внутривенная инъекция 150 мг/кг за 5 дней до введения вируса). rVSV-GP вводили внутривенно в дозе 10⁹ БОЕ/мышь, антитело аЕv6-Fc – внутривенно, в дозе 50 мг/кг. Подопытных животных наблюдали и взвешивали каждый день в течение всего эксперимента. Результаты выражали в процентах выживаемости мышей в различные временные точки.

Более детально схема эксперимента изложена в разделе «Результаты».

Определение титров rVSV-GP в органах и тканях инфицированных мышей

Органы и ткани инфицированных мышей выделяли в стерильных условиях. Кусочки органов (20 мг) гомогенизировали в 1 мл DMEM. Суспензию осветляли центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбирали для определения титров rVSV-GP в реакции вирус-нейтрализации.

Статистический анализ

Данные анализировали в EXCEL 2010 и STATISTICA 7.0. Для оценки межгрупповых различий титров антител и выживаемости использовали U-тест Манна–Уитни и тест Гехана–Уилкоксона с уровнем значимости 0.05.

Соблюдение стандартов работы с животными

Экспериментальные процедуры проводили в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных, опубликованному National Institutes of Health (NIH Publication #85–23, revised 1996), и с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009. Все эксперименты были одобрены этическим комитетом ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 27 от 2020 г.). Все лица, использовавшие животных или ухаживающих за ними в ходе исследований, проходили ежегодное обучение в соответствии с требованиями IACUC.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение панели наноантител, специфичных к EBOV GP

Панель наноантител, специфичных к EBOV GP, получали путем иммунизации альпака (*V. pacos*) рекомбинантным аденовирусом Ad5-GP и рекомбинантным белком GP в соответствии со схемой, представленной на рис. 1А.

На 5-й день после бустирующей иммунизации отбирали 150 мл крови альпака и выделяли сыворотку, в которой определяли титр антител, специфичных к EBOV GP, для подтверждения эффективности иммунизации. Титр антител к EBOV GP определен в разведении 1 : 16000, что свидетельствует о высоком иммунном ответе у иммунизированного животного (рис. 1Б).

Для создания иммунной библиотеки наноантител отбирали мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC). Нуклеотидные последовательности, кодирующие вариабельные фрагменты наноантител, полученных из PBMC альпака, клонировали в фагмидный вектор pHEN1. Специфичные антитела отбирали методом фагового дисплея как описано в [19].

Результаты отбора анализировали с помощью поликлонального фаг-ИФА (рис. 1В). В дальнейшей работе использовали библиотеку второго раунда селекции с целью предотвращения умень-

Таблица 1. Результаты анализа библиотек наноантител при помощи NGS

Клон	Частоты считываний, %		Фактор амплификации	CDR3 (аминокислотная последовательность)
	Стартовая библиотека	Библиотека после селекции		
aEv1	0.33	18.89	57.79024	NVQLGRFGILE
aEv2	0.31	7.81	24.89199	KSRRYGVVDYW
aEv3	0.01	3.70	282.6006	AAVNSWAVYSLSRNYDY
aEv4	0.05	2.01	38.44366	AMRRGGVSYTYW
aEv5	0.01	3.71	283.5078	AVRSERYTRRYDH
aEv6	0.01	0.42	31.75288	YVDARYGALHTYRS
aEv7	0.08	1.60	20.41256	NAHYWSRD
aEv8	0.01	3.38	258.5591	KVTRGDFLGRRTDY
aEv9	0.01	0.20	14.96921	AARPGSYSRDARRYD
aEv10	0.03	2.08	79.609	NAQLSRSVLWGRY
aEv11	0.01	1.29	98.88753	QQKYAGRLY
aEv12	0.05	0.97	18.59811	AADRVLTSRRNWDY
aEv13	0.01	1.54	117.9393	YARRRTYLAAY
aEv14	0.01	0.61	46.72209	AAGRSSMGLLDATDWRH
aEv15	0.01	0.85	65.3202	NSRGRHDWNRYN
aEv16	0.01	0.42	32.20649	AASPRTSMLVVGNDH
aEv17	0.01	1.39	106.5989	NAQSHFFGSNY
aEv18	0.05	0.14	2.721675	AARPEYYSGTASYVSTSYDY
Другие	98.954	48.99	0.494915	

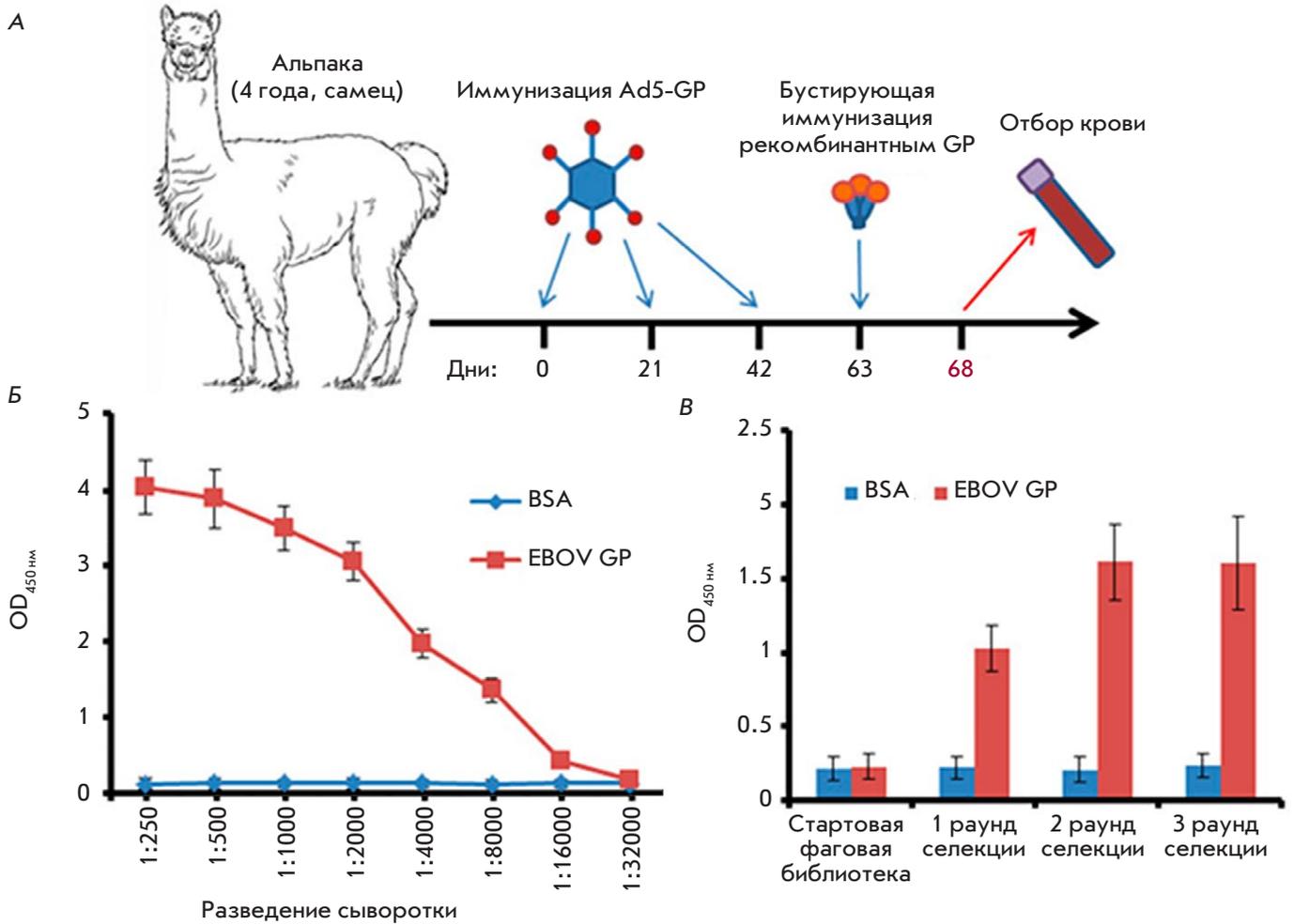


Рис. 1. Схема иммунизации альпака (*V. pacos*) для получения панели наноантител (А), определение титра антител к EBOV GP в сыворотке иммунизированного альпака (Б) и результаты поликлонального фаг-ИФА (В). Б – в иммунологические планшеты сорбировали 100 мкл (1 мкг/мл) EBOV GP (*H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*). На следующий день лунки промывали 5 раз 0.1% ФСБ-Т, а затем блокировали 5% раствором обезжиренного молока в ФСБ-Т. В лунки добавляли различные разведения сыворотки в ФСБ-Т и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После промывки добавляли антитела 5× anti-Llama IgG (Bethyl, A160-100P) в блокирующем буфере (1 : 5000) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После пятикратной промывки добавляли субстрат ТМБ и оценивали результаты. В – в иммунологические планшеты сорбировали 100 мкл EBOV GP (1 мкг/мл) (*H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*). На следующий день лунки промывали пятикратно 0.1% ФСБ-Т, а затем блокировали 5% раствором обезжиренного молока, разведенным в ФСБ-Т. Фаговые частицы (10¹¹) с каждого этапа отбора добавляли в ФСБ-Т в лунки и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Затем после 5-кратной промывки не связавшихся фагов добавляли антитела – HRP-конъюгированные anti-M13 phage IgG (Abscam, Великобритания), разведенные в блокирующем буфере в соотношении 1 : 500, и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После 5-кратной промывки добавляли субстрат ТМБ и оценивали результаты

шения разнообразия наноантител. Нуклеотидные последовательности наноантител идентифицировали при помощи секвенирования нового поколения (NGS).

В результате анализа идентифицировали 18 клонов (aE1-18) (табл. 1). Фактор амплификации 16 клонов после двух раундов селекции составил более 20, что указывает на их специфическое накопление

в результате связывания с EBOV GP. В то же время анализ библиотеки показал, что отобранные клоны составляют около 51% всех ампликонов библиотеки после селекции, тогда как в стартовой библиотеке число этих клонов было менее 1% (рис. 2А и 2Б).

По результатам непрямого ИФА с EBOV GP в качестве антигена отобрали четыре клона (aEv2, aEv3, aEv6, aEv7) как наиболее специфичные (рис. 2В).

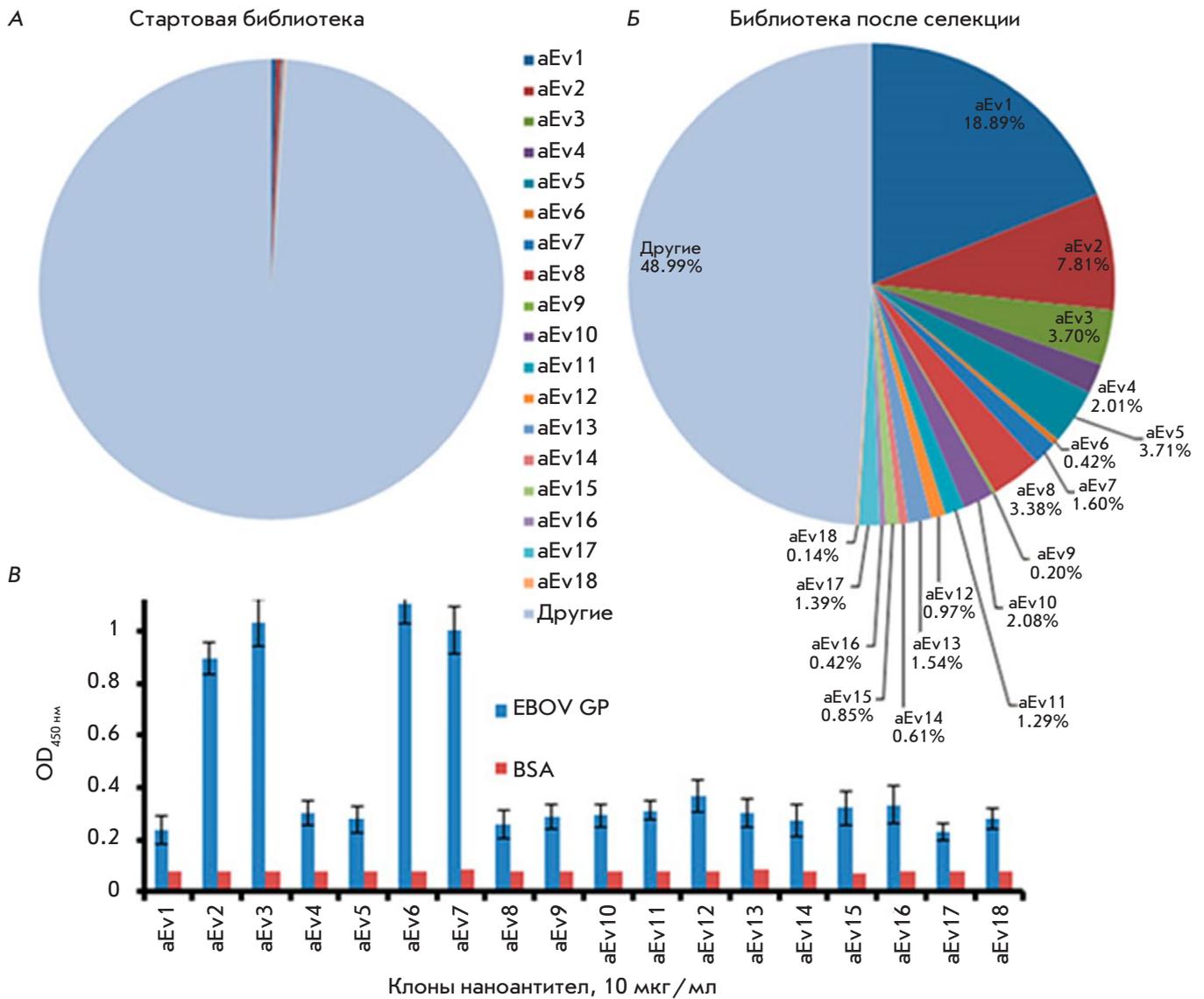


Рис. 2. Результаты сравнительного анализа соотношения специфических наноантител в библиотеках до и после отбора. А – процент клонов в стартовой библиотеке. Б – процент клонов в библиотеке после селекции. В – скрининг отобранных клонов в непрямом ИФА. aEv1–18 – клоны отобранных наноантител, EBOV GP – рекомбинантный EBOV GP, BSA – бычий сывороточный альбумин (отрицательный контроль)

На иммунологические планшеты сорбировали 100 мкл (1 мкг/мл) EBOV GP (*H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*). На следующий день лунки промывали 5 раз 0.1% ФСБ-Т, затем блокировали 5% обезжиренным молоком, растворенным в ФСБ-Т. Образцы отобранных клонов (10 мкг/мл) добавляли в лунки и инкубировали при 37°C в блокирующем буфере в течение 1 ч. После пятикратной промывки добавляли HRP-конъюгированные anti-Мус-tag IgG-антитела в блокирующем буфере (1 : 5000) на 1 ч при 37°C. После пятикратной промывки добавляли субстрат ТМБ и оценивали результаты.

Изучение отобранных клонов в реакции непрямого ИФА, поверхностного плазмонного резонанса и реакции нейтрализации вируса

Иммунологические свойства отобранных клонов aEv2, aEv3, aEv6 и aEv7 изучали с помощью ИФА, поверхностного плазмонного резонанса SPR (изменение констант аффинности, K_D) и реакции нейтрализации в условиях *in vitro*; основные результаты представлены на *рис. 3*.

По результатам непрямого ИФА рабочие титры составляли не менее 1 мкг/мл, 500 нг/мл, 500 нг/мл и 50 нг/мл для клонов aEv2, aEv3, aEv7 и aEv6 соответственно (*рис. 3А*). Самые низкие значения

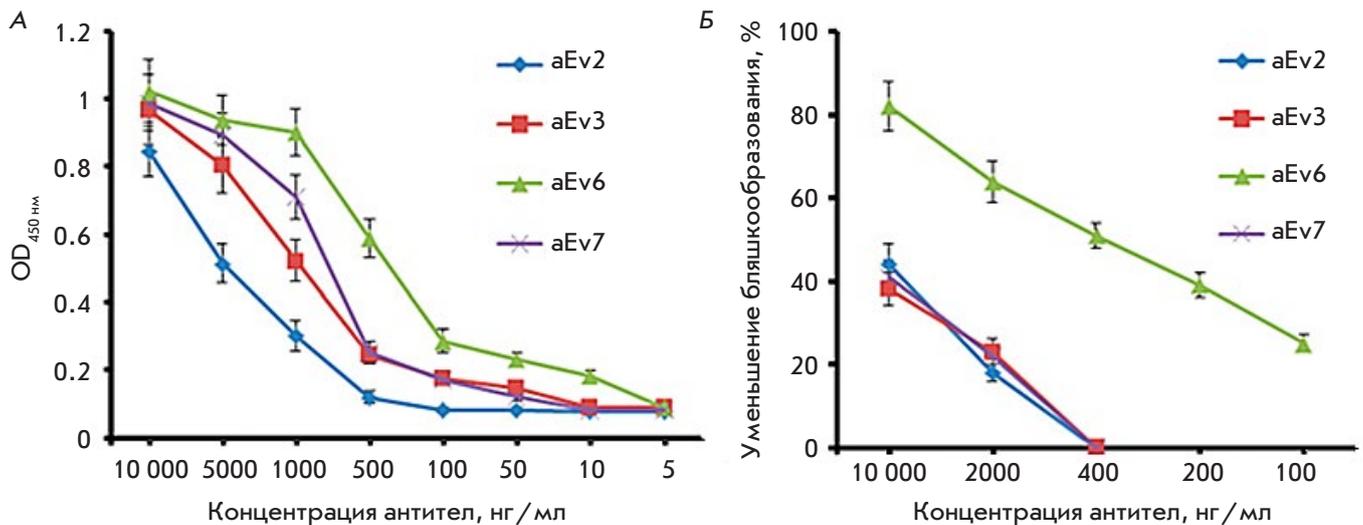


Рис. 3. Изучение активности отобранных клонов наноантител с помощью непрямого ИФА (А) и вируснейтрализующей активности (Б). А – на иммунологические планшеты сорбировали 100 мкл (1 мкг/мл) EBOV GP (*H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*). На следующий день лунки 5 раз промывали 0.1% ФСБ-Т, затем блокировали 5% обезжиренным молоком, растворенным в ФСБ-Т. Разведения антител в блокирующем буфере добавляли в лунки и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После 5-кратной промывки добавляли HRP-конъюгированные anti-Мус-tag IgG-антитела в блокирующем буфере (1 : 5000) и выдерживали 1 ч при 37°C. После 5-кратной промывки добавляли субстрат ТМБ и оценивали результаты. Б – rVSV-GP (*H. sapiens-wt/SLE/2014/Макона-G3735.1*) разводили в буфере (10 мМ Трис-НСl рН 7.5, 1 мМ EDTA, 10% сахарозы). Смесь равных объемов VNH и исходного вируса инкубировали в течение 1 ч при 37°C, затем переносили на культуральные планшеты с монослоем клеточной линии Vero E6. После адсорбции комплекса антитела+вирус (120 мин при 37°C) клетки покрывали слоем агара. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 48 ч. Результаты оценивали путем подсчета количества бляшек под микроскопом. Для определения бляшкообразующих единиц (БОЕ) использовали следующую формулу: БОЕ/мл = (среднее число БОЕ/0.2 мл) × фактор разведения

K_D имел клон аЕv6 (1.87×10^{-10} М), далее клоны аЕv3 и аЕv7 со значениями $K_D = 5.53 \times 10^{-8}$ и 2.4×10^{-8} М соответственно. Клон аЕv2 имел наиболее низкое значение $K_D = 7.13 \times 10^{-7}$ М. Как показано на рис. 3Б, клоны аЕv2, аЕv3, аЕv7 не обладали значительной вируснейтрализующей активностью против rVSV-GP, в то время как клон аЕv6 показал 50% вируснейтрализующую активность при концентрации не менее 400 нг/мл. Согласно полученным результатам для дальнейшего изучения был выбран клон аЕv6, имевший наиболее высокую аффинность к EBOV GP, а также наибольший вируснейтрализующий потенциал против rVSV-GP.

Получение клона аЕv6, модифицированного Fc-фрагментом IgG1 человека и изучение его свойств

Отобранный клон аЕv6 был модифицирован Fc-фрагментом IgG1 человека для улучшения его иммунологических и фармакокинетических свойств. Полученное антитело аЕv6-Fc показало специфичную активность к EBOV GP штамма *H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*, сравнимую с активностью

антитела MAb114, взятого в качестве контроля (рис. 4А).

Далее в реакции вирусной нейтрализации с использованием rVSV-GP сравнили антитела аЕv6-Fc и MAb114. Показано, что антитело аЕv6-Fc обладает значительно большей вируснейтрализующей активностью, чем антитело MAb114 (рис. 4Б).

Изучение фармакокинетических свойств аЕv6-Fc на макаках резусах показало, что среднее время циркуляции антител в крови после инъекции составляет не менее 7 дней (данные не представлены), что гораздо больше, чем у не модифицированных наноантител, имеющих низкую молекулярную массу [20, 21].

Оценка протективной активности антитела аЕv6-Fc на модели летальной инфекции мышей rVSV-GP

На последнем этапе оценивали защитные свойства аЕv6-Fc на модели летальной инфекции мышей rVSV-GP. Несмотря на то что наиболее репрезентативной является модель нечеловеческих приматов, финансовые и этические соображения вынуждают

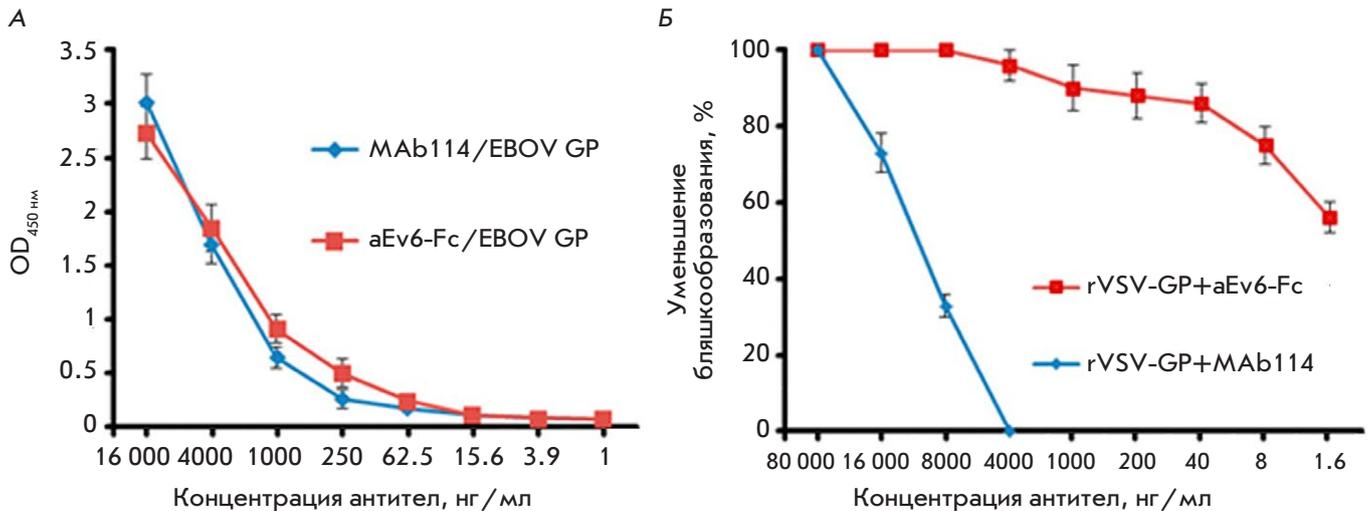


Рис. 4. Сравнение специфичной активности антител aEv6-Fc и MAb114 к EBOV GP штамма *H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15* (А) и вируснейтрализующей активности против rVSV-GP (Б). А – на иммунологические планшеты сорбировали 100 мкл (1 мкг/мл) EBOV GP (*H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*). На следующий день лунки промывали 5 раз 0.1% ФСБ-Т, затем блокировали 5% обезжиренным молоком, растворенным в ФСБ-Т. В лунки добавляли различные разведения антител aEv6-Fc и MAb114 и инкубировали при 37°C в блокирующем буфере в течение 1 ч. После 5-кратной промывки добавляли HRP-конъюгированные anti-human IgG-антитела (A8667, Sigma) в блокирующем буфере (1 : 5000) и выдерживали в течение 1 ч при 37°C. После 5-кратной промывки добавляли субстрат ТМБ и оценивали результаты. Б – разведения rVSV-GP делали в буфере (10 мМ Трис-НСl рН 7.5, 1 мМ EDTA, 10% сахарозы). Смесь равных объемов антител и вируса инкубировали в течение 1 ч при 37°C, а затем переносили на культуральные планшеты с монослоем клеточной линии Vero E6. После адсорбции комплекса антитело+вирус (120 мин при 37°C) клетки покрывали слоем агара. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 48 ч. Результаты оценивали путем подсчета количества бляшек под микроскопом. Для определения бляшкообразующих единиц (БОЕ) использовали следующую формулу: БОЕ/мл = (среднее число БОЕ/0.2 мл) × фактор разведения

разрабатывать новые модели, основанные на более мелких животных [22]. Более того, все работы с филовirusами необходимо выполнять при четвертом уровне биобезопасности [22]. Все это делает обоснованной замену природного вируса лихорадки Эбола рекомбинантным аналогом, более безопасным для человека. Таким аналогом может служить рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, псевдотипированный белком EBOV GP (rVSV-GP). Поскольку rVSV-GP не является патогенным для мышей, перед инъекцией вируса мышам вводили дексаметазон и циклофосфамид для иммуносупрессии [17]. Эксперимент проводили следующим образом: отбирали пять групп мышей по шесть особей в каждой. Животных из всех групп подвергали иммуносупрессивной терапии в течение 10 дней, после чего мышам из первой группы проводили инъекцию вируса, а животным из других групп вводили смесь вирус+антитело.

На 11 день мышам внутривенно вводили 10⁹ БОЕ rVSV-GP как в отсутствие, так и в присутствии антитела aEv6-Fc, предынкубированного с вирусом в течение 1 ч при 37°C; смешанного с вирусом непо-

средственно перед инъекцией; введенного внутривенно спустя 2 ч после инфицирования; введенного внутривенно спустя 5 ч после инфицирования. Схема эксперимента показана на рис. 5А.

За мышами наблюдали в течение 5 дней после заражения. Мыши контрольной группы, которым не вводили aEv6-Fc, погибли на второй день после заражения. Введение aEv6-Fc спустя 5 ч после заражения также не смогло предотвратить или отсрочить гибель животных. Введение антител спустя 2 ч после заражения обеспечило выживание двух из шести мышей. Предынкубация и смешивание aEv6-Fc с rVSV-GP полностью защитило животных. Результаты эксперимента представлены на рис. 5Б.

Для более детальной оценки защитных свойств антитела aEv6-Fc против rVSV-GP на модели инфекции у мышей определяли число БОЕ в крови и органах зараженных мышей. Мыши были поделены на три группы по четыре особи в каждой. Первая группа иммуносупрессированных мышей оставалась интактной. Мыши второй группы были заражены rVSV-GP. Третья группа была заражена rVSV-GP, предварительно нейтрализованным

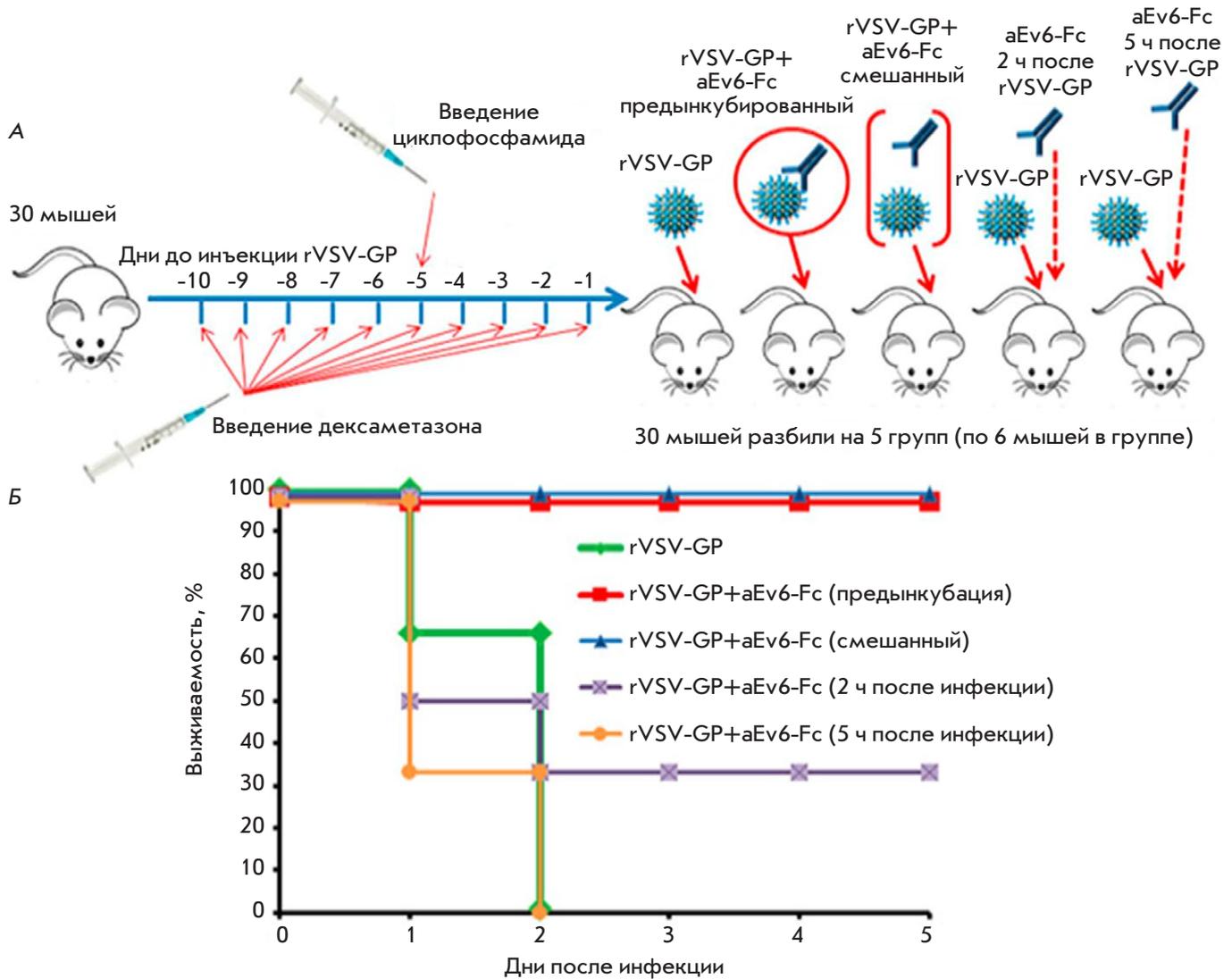


Рис. 5. Оценка протективной активности антитела aEv6-Fc. **А** – схема эксперимента; **Б** – результаты эксперимента. **А** – rVSV-GP – рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, псевдотипированный гликопротеином вируса Эбола (*H. sapiens-wt/SLE/2014/Makona-G3735.1*); aEv6-Fc – антитело aEv6-Fc. **Б** – rVSV-GP – мыши, инфицированные rVSV-GP (10^9 БОЕ/мышь); rVSV+aEv6 (предынкубация) – мыши, получившие rVSV-GP (10^9 БОЕ/мышь), ранее смешанный и инкубированный с 300 мкл антитела aEv6-Fc (3 мг/мл); rVSV-GP+aEv6-Fc (смешанный) – мыши, получившие rVSV-GP (10^9 БОЕ/мышь), предварительно смешанный с 300 мкл aEv6-Fc (3 мг/мл); rVSV-GP+aEv6-Fc (2 ч после заражения) – мыши, получившие rVSV-GP (10^9 БОЕ/мышь), а затем, спустя 2 ч, 300 мкл aEv6-Fc (3 мг/мл); rVSV-GP+aEv6-Fc (5 ч после заражения) – мыши, получившие rVSV-GP (10^9 БОЕ/мышь), а затем, спустя 5 ч, 300 мкл aEv6-Fc (3 мг/мл)

aEv6-Fc (900 мкг). Затем, спустя 1 и 2 дня, определяли присутствие rVSV-GP в мозгу, печени, почках, селезенке, кишечнике и крови зараженных мышей, используя культуру клеток Vero Е6. Результаты эксперимента показаны в *табл. 2*. В тканях и органах иммуносупрессированных мышей, не зараженных rVSV-GP (отрицательный контроль), признаки присутствия вируса не обнаружены. У животных второй группы (иммуносупрессированные мыши,

инфицированные rVSV-GP) вирус обнаружен в крови, печени, почках, селезенке в первый день после его введения. На второй день титр rVSV-GP стал значительно больше в крови и печени, в то время как в органах и тканях мышей, которым rVSV-GP вводили вместе с антителами aEv6-Fc (группа 3), вирус не был обнаружен.

Таким образом, экспериментальные данные подтверждают, что антитело aEv6-Fc обладает ви-

Таблица 2. Титры rVSV-GP в некоторых органах инфицированных мышей

Группа	День после введения	Средние титры rVSV-GP (две мыши), БОЕ/20 мкг органа					
		кровь	мозг	печень	почка	селезенка	кишечник
Интактные иммуносупрессированные мыши	1	–	–	–	–	–	–
	2	–	–	–	–	–	–
Иммуносупрессированные мыши, инфицированные rVSV-GP	1	4.44×10^5	–	6.67×10^4	4.14×10^4	3.65×10^4	–
	2	1.7×10^7	–	1.27×10^5	2.44×10^4	3.44×10^4	–
Иммуносупрессированные мыши, получившие rVSV-GP+aEv6-Fc	1	–	–	–	–	–	–
	2	–	–	–	–	–	–

Таблица 3. Иммуногенные свойства клонов aEv2, aEv3, aEv6 и aEv7

Клон	Титры к EBOV GP, нг/мл	Константа аффинности (K_D) к EBOV GP, М	Вируснейтрализующая активность в отношении rVSV-GP (PRNT50)
aEv2	Не менее 1000	7.13×10^{-7}	Не вируснейтрализующий
aEv3	Не менее 500	5.53×10^{-8}	Не менее 400 нг/мл
aEv6	Не менее 50	1.87×10^{-10}	Не вируснейтрализующий
aEv7	Не менее 500	2.4×10^{-8}	Не вируснейтрализующий

руснейтрализующей и протективной активностью в отношении летальной инфекции rVSV-GP у иммуносупрессированных мышей.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе впервые показана возможность получения наноантитела, слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека, которое обладает вируснейтрализующей и защитной активностью против вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного белком GP вируса лихорадки Эбола. Кроме того, при помощи иммунизации альпака рекомбинантным аденовирусом Ad5-GP впервые получена панель наноантител, специфичных к EBOV GP. Эту стратегию иммунизации успешно использовали ранее для получения моноклональных антител с защитной активностью против вируса лихорадки Эбола [9]. Таким образом получены четыре клон наноантител (aEv2, aEv3, aEv6 и aEv7), обладающих характеристиками, приведенными в табл. 3.

Анализируя данные, представленные в табл. 3, можно заключить, что результаты трех независимых экспериментов полностью коррелируют друг с другом. Согласно полученным данным, клон aEv6 показал наибольшую аффинность к EBOV GP и вируснейтрализующую активность в отношении rVSV-GP, поэтому этот клон был выбран для дальнейшего изучения.

Далее клон aEv6 модифицировали Fc-фрагментом IgG1 человека, увеличивающим массу наноан-

титела до 40–45 кДа, димеризующим молекулу, а также позволяющим взаимодействовать с Fc-рецепторами на поверхности клеток [21]. Эта модификация увеличила циркуляцию антитела aEv6-Fc в крови нечеловеческих приматов до 7 дней, тогда как циркуляция первичных наноантител составляет, как правило, несколько часов [20, 23, 24]. Мы использовали нечеловеческих приматов, исходя из наибольшей гомологии их иммунной системы и Fc-рецепторов с человеческими. Улучшение фармакокинетики антител является важным аспектом, позволяющим значительно уменьшить дозу и количество инъекций препарата при терапии вирусных заболеваний. Кроме того, модифицированное антитело aEv6-Fc имело сопоставимый уровень специфической активности в ИФА с антителом MAb114 (рис. 4А), обладающим протективной активностью в отношении вируса лихорадки Эбола [25], и более выраженную вируснейтрализующую активность по сравнению с MAb114 (рис. 4Б), а также по сравнению с немодифицированной Fc-фрагментом формой антитела.

Последним этапом исследования стало изучение протективной активности aEv6-Fc на модели летальной инфекции мышей вирусом везикулярного стоматита, псевдотипированного EBOV GP. Эта модель разработана нами во избежание необходимости работы с природным вирусом лихорадки Эбола и использования нечеловеческих приматов (дорогостоящего и нежелательного по этическим со-

ображениям [22]). Доза препарата (50 мг/кг) была выбрана, исходя из опубликованных данных [25]. Экспериментально показано, что антитело аЕv6-Fc полностью защищало мышей при предынкубации с вирусом и при смешивании с вирусом перед инъекцией, а также обладало 30% защитой, если его вводили не позже 2 ч после заражения вирусом. Таким образом, антитело аЕv6-Fc может проявлять протективную активность в режиме профилактики и экстренной терапии непосредственно после предполагаемого контакта с возбудителем. Детальный анализ накопления rVSV-GP в органах и тканях инфицированных мышей выявил наибольшее количество вируса в крови, печени, почках и селезенке, тогда как в мозге и кишечнике rVSV-GP не обнаружен. Полученные данные могут быть связаны с псевдотипированием вируса везикулярного стоматита гликопротеином EBOV GP, который, по-видимому, изменяет тропизм вируса. Изменения в тропизме rVSV, в свою очередь, могут объяснять накопление вируса в почках, селезенке, особенно

в печени и крови, что, по-видимому, вызывает полиорганную недостаточность и гибель животных на второй день после инфицирования. Важно отметить, что в органах и тканях мышей, инфицированных rVSV-GP, инкубированным с аЕv6-Fc, вирус не обнаружили, что еще раз подтверждает вируснейтрализующую и протективную активность антитела.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании впервые показана принципиальная возможность получения наноантител и их модификаций, специфичных к поверхностному гликопротеину вируса лихорадки Эбола и обладающих выраженной противовирусной активностью в летальной модели мышей, инфицированных псевдотипированным вирусом везикулярного стоматита. ●

Мы благодарим А.И. Смирнова (владелец фермы «Русские Альпаки») за предоставление альпака для нашего исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Siragam V., Wong G., Qiu X. // Zool. Res. 2018. V. 39. № 1. P. 15–24.
- Zhu W., Banadyga L., Emeterio K., Wong G., Qiu X. // Viruses. 2019. V. 11. № 11. e999.
- Qiu X., Fernando L., Melito P.L., Audet J., Feldmann H., Kobinger G., Alimonti J.B., Jones S.M. // PLoS Neglected Tropical Diseases. 2012. V. 6. № 3. e1575
- Qiu X., Audet J., Wong G., Pillet S., Bello A., Cabral T., Strong J.E., Plummer F., Corbett C.R., Alimonti J.B., et al. // Sci. Transl. Med. 2012. V. 4. № 138. P. 138ra81.
- ECDC. Ebola outbreak in the Democratic Republic of the Congo – ongoing. URL: <https://ecdc.europa.eu/en/ebola-virus-disease-outbreak-democratic-republic-congo-ongoing> (accessed August 9, 2019).
- Moekotte A.L., Huson M.A., van der Ende A.J., Agnandji S.T., Huizenga E., Goorhuis A., Grobusch M.P. // Expert Opin. Investigat. Drugs. 2016. V. 25. № 11. P. 1325–1335.
- 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. P. 1339–1342. Suppl. Materials.
- Hoenen T., Groseth A., Feldmann H. // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. № 10. P. 593–606.
- Shcheblyakov D., Esmagambetov I., Simakin P., Kostina L., Kozlov A., Tsibezov V., Grebennikova T., Chifanov D., Rumyantseva I., Boyarskaya N., et al. // Antiviral Res. 2019. V. 172. e104617.
- Dolzhenkova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Dzharrullaeva A.S., Tukhvatulina N.M., Shcheblyakov D.V., Shmarov M., Tokarskaya E., Simakova Y., Egorova D., et al. // Human Vaccines Immunotherapeutics. 2017. V. 13. № 3. P. 613–620.
- Wu Y., Jiang S., Ying T. // Front. Immunol. 2017. V. 8. P. e1802.
- De Vlioger D., Ballegeer M., Rossey I., Schepens B., Saelens X. // Antibodies (Basel). 2018. V. 8. № 1. e1.
- Liu J.L., Shriver-Lake L.C., Anderson G.P., Zabetakis D., Goldman E.R. // Microbial Cell Factories. 2017. V. 16. № 1. e223.
- Darling T.L., Sherwood L.J., Hayhurst A. // Front. Immunol. 2017. V. 8. e1197.
- Sherwood L.J., Hayhurst A. // PLoS One. 2013. V. 8. № 4. e61232.
- Brunton B., Rogers K., Phillips E.K., Brouillette R.B., Bouls R., Butler N.S., Maury W. // PLoS Neglected Tropical Diseases. 2019. V. 13. № 6. e0006983.
- Marathe B.M., Mostafa H.H., Vogel P., Pascua P.N.Q., Jones J.C., Russell C.J., Webby R.J., Govorkova E.A. // Antiviral Res. 2017. V. 148. P. 20–31.
- Shcherbinin D.N., Esmagambetov I.B., Noskov A.N., Selyaninov Y.O., Tutykhina I.L., Shmarov M.M., Logunov D.Yu., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L., et al. // Acta Naturae. 2014. V. 6. № 1. P. 76–84.
- Godakova S.A., Noskov A.N., Vinogradova I.D., Ugriumova G.A., Solovyev A.I., Esmagambetov I.B., Tukhvatulin A.I., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Shcheblyakov D.V. // Toxins (Basel). 2019. V. 11. № 8. e464.
- Cortez-Retamozo V., Lauwereys M., Hassanzadeh Gh.G., Gobert M., Conrath K., Muyldermans S., De Baetselier P., Revets H. // Internat. J. Cancer. 2002. V. 98. № 3. P. 456–462.
- Harmsen M.M., van Solt C.B., Fijten H.P., van Setten M.C. // Vaccine. 2005. V. 23. № 41. P. 4926–4934.
- St Claire M., Ragland D., Bollinger L., Jahrling P. // Comp. Med. 2017. V. 67. № 3. P. 253–262.
- Huston J.S., George A.J., Adams G.P., Stafford W.F., Jamar F., Tai M.S., McCartney J.E., Oppermann H., Heelan B.T., Peters A.M., et al. // Quarterly J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 1996. V. 40. P. 320–333.
- Batra S.K., Jain M., Wittel U.A., Chauhan S.C., Colcher D. // Curr. Opin. Biotechnol. 2002. V. 13. P. 603–608.
- WHO. WHO R&D Blueprint – Ad-hoc Expert Consultation on clinical trials for Ebola Therapeutics. Appendix 4. URL: <https://www.who.int/ebola/drc-2018/treatments-approved-for-compassionate-use-update/en/> (accessed January, 2020).