УДК 57.083.3

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА RabD4, СПЕЦИФИЧНОГО К ГЛИКОПРОТЕИНУ ВИРУСА БЕШЕНСТВА

Е. Н. Ильина^{1,*}, Е. В. Солопова², Т. К. Алиев¹, М. В. Ларина³,
Д. С. Балабашин³, Н. Е. Варламов², Д. А. Долгих^{1,3}, П. Г. Свешников²,
академик РАН М. П. Кирпичников^{1,3}

Поступило 11.12.2018 г.

При помощи стимуляции *in vitro* человеческих В-лимфоцитов, выделенных из периферической крови вакцинированного донора, получили новое нейтрализующее человеческое антитело RabD4 против гликопротеина вируса бешенства. Антитело обладало высокой антигенсвязывающей способностью и вируснейтрализующей активностью в отношении вируса бешенства, установленной с помощью флуоресцентного вируснейтрализующего теста.

Ключевые слова: вирус бешенства, моноклональные антитела, гликопротеин, FAVN, постэкспозиционная профилактика.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524853370-373>

Единственным способом предотвращения развития бешенства у людей и уменьшения летальности заболевания, составляющей 100%, на сегодняшний день является пре- и постэкспозиционная профилактика [1]. Она осуществляется с помощью лошадиных поликлональных (ERIG, Equine Rabies Immunoglobulin) или человеческих (HRIG, Human Rabies Immunoglobulin) сывороток, а также с помощью вакцинации. Метод в целом эффективен, но такие недостатки поликлональных антирабических иммуноглобулинов, как вариабельность препарата от партии к партии, иммуногенность (при использовании ERIG), опасность передачи инфекционных заболеваний, дороговизна и ограниченная распространённость, приводят к необходимости разработки новых, более доступных и безопасных препаратов, которыми могут стать гуманизированные или полностью человеческие моноклональные антитела (МАТ), специфически связывающиеся с гликопротеином вируса бешенства (RABVG) и нейтрализующие тем самым сам вирус.

Целью настоящего исследования явилось получение человеческого нейтрализующего МАТ против

RABVG, изучение его иммунохимических свойств и вируснейтрализующей активности с помощью флуоресцентного вируснейтрализующего теста (FAVN).

На первом этапе были выполнены работы по получению гетерогибридом на основе человеческих В-лимфоцитов, продуцирующих антитела к RABVG. Для этого из периферической крови донора, иммунизированного вакциной Рабипур[®] (“Chiron Behring Vaccines Private, Ltd.”, Индия), мы выделили с использованием наборов RosetteSep[™] (“StemCell Technologies, Inc.”, США) следующие клеточные субпопуляции: моноциты, В- и Т-лимфоциты CD4⁺, — согласно инструкции производителя.

Из 1,1 млн моноцитов в результате инкубации в среде Dendritic Cell Medium (DC) (“CellGenix GmbH”, Германия) с добавлением 500 ед./мл интерлейкина 4 (ИЛ-4) и 800 ед./мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора мы сначала получили незрелые дендритные клетки. Далее после инкубации с рекомбинантным RABVG (“MyBioSource”, США) в концентрации 5 мкг/мл — зрелые дендритные клетки, нагруженные RABVG.

Выделенные на предыдущем этапе В-лимфоциты сначала выращивали в течение 8 ч при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO₂, вместе с антигеном RABVG (5 мкг/мл). Затем В-клетки стимулировали *in vitro* в присутствии полученных ранее Т-лимфоцитов CD4⁺, зрелых дендритных клеток и цитокинов: ИЛ-2 (20 ед./мл), ИЛ-4 (500 ед./мл), ИЛ-6

¹ Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

² Всероссийский научный центр
молекулярной диагностики и лечения, Москва

³ Институт биоорганической химии
им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
Российской Академии наук, Москва

*E-mail: Ekaterina.iljina.7@yandex.ru

(1800 ед./мл), ИЛ-10 (2 ед./мл). Через 5 сут культивирования к клеткам добавляли митоген лаконоса *Phytolacca americana* (“Sigma-Aldrich”, США, 4 мкг/мл). Ещё через 3 сут клетки осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 10 мин. Супернатанты тестировали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с рекомбинантным RABVG для выявления антител, специфически взаимодействующих с антигенными детерминантами. Соответствующие В-лимфоциты использовали для слияния с гетерогрибидомой человек–мышь с целью получения гетерогрибридом, продуцирующих мАТ против RABVG. Соматическую гибридизацию иммунных В-лимфоцитов человека с клетками миеломы осуществляли по стандартной методике [2] с использованием ПЭГ 4000 и селекции клонов на среде ГАТ.

Для отбора гибридных клонов, продуцирующих человеческие антитела против RABVG, использовали сэндвич-метод ИФА по схеме анти-IgG1 антитело (Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, ВНЦМДЛ)–супернатант–Рабикур–мАТ 1C5-HRP [3]. Далее клетки клонировали методом предельных разведений, в результате чего был отобран стабильный клон RabD4.

Для дальнейшей характеристики мАТ RabD4 получили в рекомбинантном виде. Для этого из клеток гетерогрибридомы RabD4 выделили суммарную РНК и получили кДНК, на матрице которой с помощью генспецифических праймеров амплифицировали нуклеотидные последовательности, кодирующие переменные домены лёгкой и тяжёлой цепей мАТ RabD4.

Целевое рекомбинантное человеческое мАТ RabD4 получили в результате транзientной экспрессии в клетках китайского хомячка (CHO) с использованием плазмид на основе вектора pcDNA 3.4, кодирующих лёгкую и тяжёлую цепи мАТ RabD4. Целевой белок был очищен с помощью аффинной хроматографии на протеин А-сефарозе (рис. 1 и 2).

Функциональную активность мАТ RabD4 подтвердили с помощью непрямого ИФА с использованием в качестве антигена нативного RABVG, который сорбировали на планшеты в концентрации 10 мкг/мл, и антивидовых поликлональных антител (ВНЦМДЛ) против человеческого иммуноглобулина, конъюгированных с пероксидазой хрена (рис. 3). В качестве положительных контролей использовали два известных мАТ к RABVG с подтверждённой нейтрализующей активностью — CR57 и CR4098, разработанные компанией “Crucell” (Нидерланды) и взаимодействующие с антигенными сайтами RABVG I и III соответственно [4]. Ранее [3]

Рис. 1. Электрофореграмма человеческого мАТ RabD4 в 10% SDS-ПААГ в восстанавливающих (1) и невосстанавливающих (2) условиях. Здесь и на рис. 4 М — маркеры молекулярной массы, кДа.

Рис. 2. Аналитическая гель-фильтрационная хроматография мАТ RabD4 на колонке Superdex 200-10/300-GL, очищенного на протеин А-сефарозе.

эти контрольные антитела были экспрессированы нами в клетках CHO. Из полученных в настоящей работе данных следует, что мАТ RabD4 обладает высоким сродством к RABVG.

Способность мАТ RabD4 взаимодействовать с RABVG исследовали также методом иммуноблоттинга. Белки, разделённые в 12%-м SDS-ПААГ [5], переносили на нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,45 мкм (“ADVANTEC”, Дания). Антитело в концентрации 10 мкг/мл инкубировали с RABVG в течение 1 ч. Для детекции связывания антител с антигеном использовали пероксидазный конъюгат антивидовых поликлональных антител против IgG человека (рис. 4).

Рис. 3. Непрямой ИФА связывания с нативным RABVG человеческого мАТ RabD4 (1), мАТ CR57 (2), мАТ CR4098 (3). На графике приведены средние значения и стандартные отклонения оптической плотности, измеренной при 450 нм, $n = 3$.

Рис. 4. Вестерн-блот-анализ связывания человеческого мАТ RabD4 с нативным RABVG. 1 — RABVG, 2 — мАТ RabD4, 3 — отрицательный контроль.

Вируснейтрализующую активность рекомбинантного мАТ RabD4 исследовали в тесте FAVN с использованием культурального штамма вируса бешенства CVS-11 при сравнении с двумя международными стандартами ВОЗ антирабического иммуноглобулина — Second International Standard for Rabies Immunoglobulin, Copenhagen, Denmark (30 МЕ/мл) и European Pharmacopoeia Reference Standard Human rabies immunoglobulin BPR, Strasburg (91 МЕ/мл) — и рассчитывали в МЕ/мл. Результаты теста FAVN показали, что мАТ RabD4 обладает ви-

Таблица 1. Значения антирабической активности образцов антител

Образец	Антирабическая активность, МЕ/мл
мАТ RabD4	829,8
мАТ CR57	246,8
мАТ CR4098	788,1

руснейтрализующей активностью, сопоставимой с контрольными антителами (табл. 1).

Таким образом, стимуляция *in vitro* человеческих периферических В-лимфоцитов с последующей иммортализацией отобранных клонов путём создания гетерогридом позволила выделить высокоспецифичное мАТ RabD4 против RABVG. Человеческая природа RabD4, обуславливающая низкую иммуногенность при введении людям, является важным фактором при создании на его основе препарата для профилактики бешенства у людей. В результате экспрессии рекомбинантного мАТ RabD4 в клетках CHO мы получили функционально активное полноразмерное антитело, обладающее вируснейтрализующей активностью, сопоставимой с активностью референсных антител CR57 и CR4098.

Благодарности. Авторы благодарят Т.В. Гребенникову (ФГБУ “Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи” МЗ РФ, Москва) за проведение теста FAVN.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60716X0154).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fisher C.R., Streicker D.G., Schnell M.J. // Nature Rev. Microbiol. 2018. V. 16. P. 241–255.
2. Kohler G., Milstein C. // Nature. 1975. V. 256. P. 495–497.
3. Ilina E.N., Solopova O.N., Balabashin D.S., Larina M.V., Aliev T.K., Grebennikova T.V., Losich M.A., Zaykova O.N., Sveshnikov P.G., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 1–11.
4. de Kruif J., Bakker A.B., Marissen W.E., Kramer R.A., Throsby M., Rupprecht C.E., Goudsmit J. // Annu. Rev. Med. 2007. V. 58. P. 359–368.
5. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

**THE GENERATION OF THE HUMAN MAB RabD4
SPECIFIC TO THE RABIES VIRUS GLYCOPROTEIN
AND CHARACTERIZATION THEREOF**

**E. N. Ilina¹, E. V. Solopova², T. K. Aliev¹, M. V. Larina³,
D. S. Balabashin³, N. E. Varlamov², D. A. Dolgikh^{1,3},
P. G. Sveshnikov², Academician of the RAS M. P. Kirpichnikov^{1,3}**

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

² All-Russian Scientific Center for Molecular Diagnostics and Treatment,
Moscow, Russian Federation

³ Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

Received December 11, 2018

We generated a novel human neutralizing human mAb RabD4 against rabies virus glycoprotein using in vitro stimulation human peripheral B cells produced from immunized donor. It was revealed that the human mAb RabD4 demonstrated high antigen-binding activity and virus-neutralizing activity in the FAVN test with the CVS-11 rabies virus.

Keywords: rabies virus, monoclonal antibodies, glycoprotein, FAVN, post-exposure prophylaxis.