

УДК 578.74

ПОЛУЧЕНИЕ ГУМАНИЗИРОВАННОГО Fab-ФРАГМЕНТА НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА

П.Г. Свешников¹, Т.А. Ягудин², Е.В. Морозкина², Е.В.Клячко², С.С. Зацепин², С.В. Беневоленский², О.Б. Шемчукова³, Л.П. Позднякова³, О.Н. Солопова³

(¹кафедра биоинженерии биологического факультета МГУ; ²Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН; ³ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения»; e-mail: petersveshnikov@list.ru)

Получен функциональный гуманизированный Fab-фрагмент нейтрализующего антитела против вируса бешенства – прототип терапевтического средства, способного заменить лошадиный или донорский антирабический иммуноглобулин. Проведено клонирование и секвенирование переменных фрагментов легкой и тяжелой цепей высокоаффинного нейтрализующего антитела против вируса бешенства. Проведены замена константных мышинных участков на человеческие, наработка гуманизированных Fab-фрагментов в дрожжевой системе экспрессии. Исследованы иммунохимические свойства полученных Fab-фрагментов методами ИФА, электрофореза в ПААГ и вестерн-блота. Получен гуманизированный Fab-фрагмент антитела против вируса бешенства, по аффинности превосходящий исходное антитело. Высокая степень гуманизации подтверждена при помощи сывороток, специфичных по отношению к человеческим иммуноглобулинам. Выход гуманизированного Fab-фрагмента составил 21 мг из 1 л культуральной среды, в препарате отсутствуют изолированные легкие и тяжелые цепи гуманизированного Fab-фрагмента.

Ключевые слова: вирус бешенства, Fab-фрагмент, гуманизация.

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения более 55 тыс. человек в мире ежегодно умирают от бешенства, более половины из них – дети до 15 лет [1]. Переносчиками вируса бешенства являются зараженные животные, главным образом собаки. Только в Москве ежегодно фиксируется более 30 тысяч укусов собаками, при этом в большинстве случаев нельзя исключить инфицирование вирусом бешенства, поскольку досимптомной диагностики бешенства не существует. В случае развития симптомов болезнь становится практически неизлечимой и приводит к быстрой смерти [2].

Основным способом борьбы с бешенством на сегодняшний день является иммунизация человека и домашних животных. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует поголовную профилактическую вакцинацию домашних животных (кошек и собак) и антирабическую вакцинацию людей в случае их контакта с животным, у которого подозревается бешенство. После контактов третьей категории, к которым относятся укусы, а также для людей с ослабленной иммунной системой ВОЗ рекомендует пассив-

ную иммунизацию, т.е. введение антирабического иммуноглобулина [1]. В качестве такого иммуноглобулина применяют лошадиную сыворотку, содержащую антитела против вируса бешенства. Серьезные побочные эффекты вплоть до анафилактического шока, а также быстрый клиренс заметно ограничивают применение сывороток животного происхождения. Энзиматическое расщепление иммуноглобулинов лошадиной сыворотки до Fab'-фрагментов лишь частично снижает иммуногенность, приводя к существенному удорожанию препарата [3]. Человеческий иммуноглобулин от вакцинированных добровольцев не может удовлетворить всех потребностей в нем. Кроме того, препараты, полученные с использованием человеческого материала, несут в себе опасность ятрогенного инфицирования.

Заменой человеческого иммуноглобулина, предохраняющего от заболевания бешенством, могут стать гуманизированные моноклональные антитела, способные нейтрализовать вирус. Ранее в нашей лаборатории была получена панель мышинных моноклональных антител к вакцинному штамму вируса бешенства (ВБ)

“Внуково-32” [4]. В результате детального изучения свойств антител [4, 5] было отобрано антитело 1С5, имеющее следующие свойства:

- 1) взаимодействует с гликопротеидом ВБ;
- 2) взаимодействует со всеми исследованными штаммами ВБ (всего было исследовано 33 штамма, среди которых все основные штаммы ВБ, встречающиеся на территории России, а также штаммы из Центральной Европы, Украины, США и Африки);
- 3) обладает вируснейтрализующей активностью порядка 10^7 LD50 как по отношению к вакцинному штамму “Внуково-32”, так и по отношению к диким штаммам ВБ, тогда как аналогичный показатель для коммерческого лошадиного иммуноглобулина составляет $6,6 \cdot 10^2$ LD50;
- 4) обладает 100%-м лечебным действием: мыши, зараженные сверхлетальными дозами ВБ (8–10 LD50), выживали без развития симптомов бешенства, если в течение 2–48 ч после заражения им был введен препарат на основе антитела 1С5. Коммерческий лошадиный иммуноглобулин защищал только 16% зараженных животных.

Все перечисленные выше свойства антитела 1С5 дают ему явные преимущества по сравнению с лошадиным иммуноглобулином. К этому нужно добавить простоту стандартизации препаратов на основе моноклональных антител по сравнению с поликлональными сыворотками. Однако антитело мышиноного происхождения не может считаться идеальным терапевтическим средством, поскольку имеет иммуногенные свойства. Для устранения иммуногенности константные области мышиноного антитела должны быть заменены на человеческие.

Материалы и методы

Для амплификации плазмид мы использовали штамм *E. coli* Top10F' (*Invitrogen*), для дрожжевой трансформации – штамм *Pichia pastoris* GS115 (*Invitrogen*). Вектор pPICZ α A (*Invitrogen*) использовали для создания дрожжевых экспрессионных векторов.

Для построения пространственной модели Fv-фрагмента антитела 1С5 по его аминокислотной последовательности использовали Интернет-программу WAM [6].

ДНК-фрагменты, кодирующие тяжелую и легкую цепи гуманизированного Fab-фрагмента антитела 1С5, были синтезированы из перекрывающихся олигонуклеотидов [7] и клонированы по сайтам *XhoI-XbaI* в вектора pPICZ α A и pPICZ α A- Δ *PmeI* соответственно. В результате были получены плазмиды pPICZ α A-AR-N и pPICZ α A- Δ *PmeI*-AR-L. Плазида pPICZ α A-

AR-NL, содержащая обе цепи Fab-фрагмента в составе вектора, была получена путем клонирования *BglII-BamHI*-фрагмента вектора pPICZ α A- Δ *PmeI*-AR-L в *BglII*-сайт вектора pPICZ α A-AR-N.

Плазида была линейаризована по *PmeI* и введена в клетки штамма GS115 с помощью электропорации [8]. Трансформанты были отобраны на полной среде с глюкозой (YPD), содержащей ZeocinTM в концентрации 100 мкг/мл.

Интеграция линейаризованного вектора в геном рекомбинантных клонов *P. pastoris* подтверждена с помощью ПЦР с использованием праймеров, специфичных к генам антител и геномной ДНК трансформантов в качестве матрицы [9].

Отобранные трансформанты выращивали аналогично методике, приведенной в [10]. Культуральные жидкости трансформантов проанализированы с помощью непрямого ИФА. Определение констант связывания антител проводили, как описано в методике [11], с модификациями [12].

Специфичность моноклонального антитела определяли методом вестерн-блот [13], используя гликопротеид ВБ. Степень чистоты рекомбинантного человеческого Fab' контролировали при помощи электрофореза в 10%-м полиакриламидном геле в присутствии SDS в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях в ступенчатой буферной системе Лэмбли [14].

Результаты

Гены, кодирующие мышиноное моноклональное антитело (мАт) 1С5, были клонированы из соответствующей гибридомы и секвенированы, как описано в работе [10]. Полученную аминокислотную последовательность переменных доменов мАт 1С5 и молекулярное моделирование использовали для конструирования гуманизированного варианта мАт 1С5 аналогично тому, как это было описано для мАт F19 [15].

Сначала были определены границы каркасных областей (Framework), согласно работе [16]. Для каждой каркасной области мы нашли 50 ближайших гомологов в базах данных мышиноных и человеческих антительных последовательностей гаметной ДНК. Несколько систематических различий было найдено при сравнении мышиноной и человеческих выборок. Аминокислоты в таких позициях рассматривались в качестве кандидатов на гуманизацию [17].

При анализе последовательностей переменных доменов мышиноного антитела 1С5 мы идентифицировали возможные ключевые аминокислотные остатки, определяющие связывание с антигеном, а именно определили аминокислотные остатки, которые являются

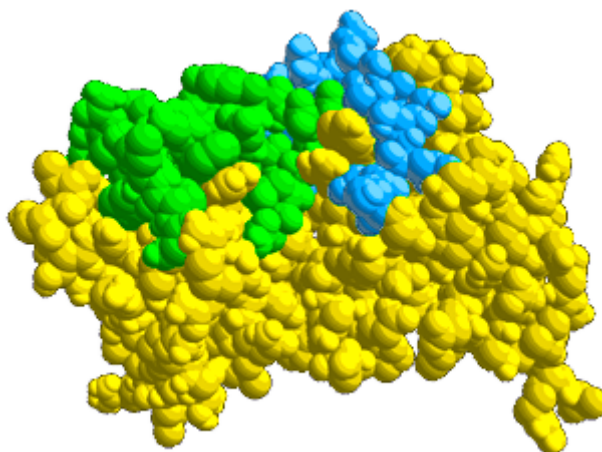


Рис. 1. Гипотетическая пространственная модель антигенсвязывающего центра мышинового моноклонального антитела 1C5

частью канонических структур конформаций CDR, предложенных в работе [18] (эти остатки потенциально участвуют в укладке V_L-V_H [18]). Были также найдены аминокислоты, редко встречающиеся в последовательностях мышинных антител [19]. При анализе пространственной модели Fv-фрагмента мышинового антитела против вируса бешенства (рис. 1) были определены аминокислотные остатки, которые находятся в радиусе 5 Å от CDR и могут участвовать в связывании с антигеном.

Все вышеперечисленные позиции были исключены из числа кандидатов на гуманизацию. В итоге мы получили консенсусную последовательность гуманизованного переменного домена антитела 1C5, состоящую из аминокислот, наиболее часто встречающихся в человеческих гомологах мышинового антитела 1C5, а также аминокислот мышинового антитела 1C5, определяющих связывание с антигеном. Из полученных последовательностей были удалены любые потенциальные сайты гликозилирования. Кроме того, были сделаны обратные замены на мышинные аминокислоты из-за опасности нарушить конформацию Fv-фрагмента (3 для тяжелой цепи и 1 для легкой). Таким образом мы получили последовательность гуманизованного переменного домена антитела 1C5 (рис. 2).

Аминокислотная последовательность цепей гуманизованного Fab-фрагмента была получена путем слияния аминокислотной последовательности гуманизованных V_H и V_L с аминокислотной последовательностью человеческих константных доменов IgG1 C_{H1} и C_{κ} соответственно [20]. Нуклеотидная последовательность цепей гуманизованного Fab-фрагмента была составлена из наиболее часто встречающихся в *P. pastoris* кодонов.

Гены легкой и тяжелой цепей Fab-фрагмента гуманизованного антитела 1C5 были синтезированы из набора перекрывающихся олигонуклеотидов с помощью ПЦР и собраны на экспрессионном векторе pPICZ α A.

В результате мы получили плазмиду pPICZ α A-AR-human-HL, которой трансформировали клетки штамма *P. pastoris* GS115. Был отобран штамм GS115/AR-human, продуцирующий гуманизованные Fab-фрагменты антитела 1C5 с выходом 21 мг/л.

Аффинно очищенные из супернатанта Fab-фрагменты сравнивали по связыванию с гликопротеидом ВБ с мышинным Fab-фрагментом и полноразмерным антителом (таблица). Результаты, представленные в таблице, указывают на то, что гуманизованные Fab-фрагменты обладают аффинностью не меньшей, чем у исходного полноразмерного антитела 1C5.

Fab-фрагменты при разделении в SDS-ПААГ дают одиночную полосу с мобильностью, соответствующей предполагаемой массе Fab-фрагмента 50 кДа. Электрофорез в восстанавливающих условиях дает полосы, соответствующие предполагаемым значениям массы свободных тяжелых и легких цепей (рис. 3) [21].

Специфичность и степень гуманизации полученных Fab-фрагментов определяли при помощи вестерн-бло-

Значения аффинности (K_d) для полноразмерного мышинового антитела 1C5, рекомбинантного мышинового Fab-фрагмента и гуманизованного Fab-фрагмента антитела 1C5

K_d		
полноразмерное мышинное антитело 1C5	рекомбинантный мышинный Fab-фрагмент	рекомбинантный гуманизованный Fab-фрагмент
$1,9 \times 10^{-9}$ М	$2,7 \times 10^{-9}$ М	$1,2 \times 10^{-9}$ М



Рис. 2. Сравнение мышиной, консенсусной и гуманизированной аминокислотных последовательностей переменного домена тяжелой (а) и легкой (б) цепей антитела 1С5

Заключение

та (рис. 4). Полученный Fab-фрагмент связывает гликопротеид ВВ (данные не приведены). На высокую степень гуманизации указывает тот факт, что моноклональные антитела, специфичные к каппа-цепям иммуноглобулинов человека, узнают гуманизированный Fab-фрагмент, тогда как антитела против каппа-цепей иммуноглобулинов мыши гуманизированный Fab-фрагмент практически не связывают.

В результате проведенной работы была определена аминокислотная последовательность переменных фрагментов мышинового нейтрализующего антитела против вируса бешенства 1С5. Был получен рекомбинантный Fab-фрагмент этого антитела, не уступающий по аффинности исходному антителу. В результате замены константных областей мышинового Fab-фрагмента на последовательности, наиболее часто

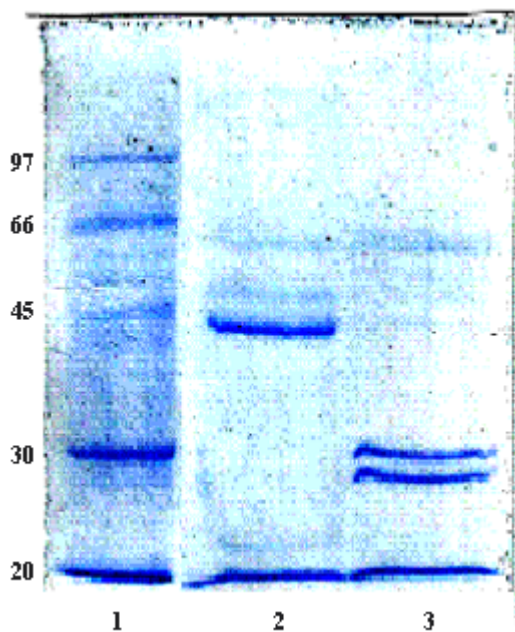


Рис. 3. Электрофорез в ПААГ гуманизованного Fab-фрагмента антитела 1C5: 1 – стандарты, 2 – ЭФ в невосстанавливающих условиях, 3 – ЭФ в восстанавливающих условиях

встречающиеся в человеческих иммуноглобулинах, мы получили гуманизованный Fab-фрагмент. Выход гуманизованного Fab-фрагмента составил 21 мг из 1 л культуральной среды. Примесей изолированных тяжелых и легких цепей, по данным электрофореза и вестерн-блота, обнаружено не было. Специфичность гуманизованного Fab-фрагмента была подтверждена при помощи ИФА и вестерн-блота, его аффинность не уступает исходному полноразмерному антителу 1C5. Взаимодействие с антителами против каппа-цепей иммуноглобулинов человека при отсутствии заметного связывания с антителами против иммуноглобулинов мыши указывает на высокую степень гу-

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта АФГИР № RBO-11041-МО-04 и Госконтракта Роснаука № 02, 512, 12,2057.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всемирная организация здравоохранения, информационный бюллетень № 99. 2008. декабрь.
2. Hildegund C.J. // *Negl Trop Dis*. 2009. **3**. N 9. P. 515.
3. Fernandes A., Kaundinya J.O., Daftary G., Saxena L., Banerjee S. // *J. Chromatogr B Analyt. Technol. Biomed Life Sci*. 2008. **876**. P. 109.
4. Грибенча С.В., Василенко О.В., Фуралев В.А., Ключник С.Ю., Кузьмицкая Т.М., Свешников П.Г., Баринский И.Ф. // *Вопросы вирусологии*. 1991. № 4 С. 318.
5. Грибенча С.В., Василенко О.В., Кузьмицкая Т.М., Фуралев В.А., Свешников П.Г., Татаров А.Г., Колотвина П.В., Баринский И.Ф. // *Вопросы вирусологии*. 1991. № 5. С. 399.

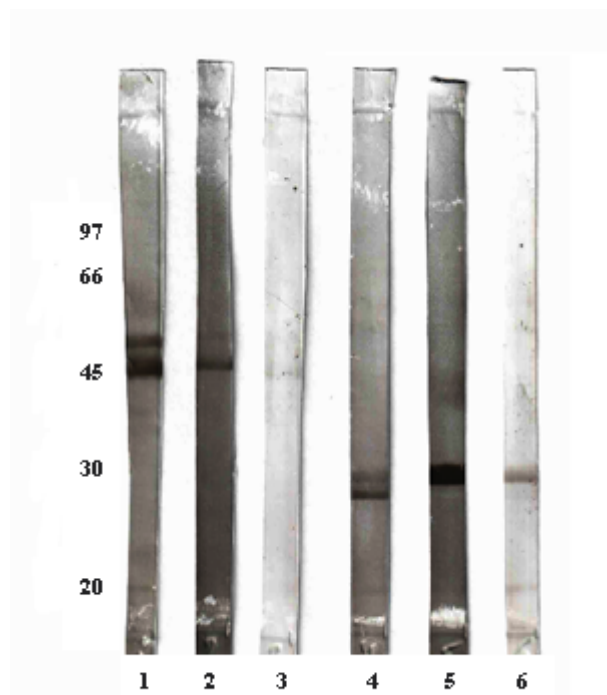


Рис. 4. Вестерн-блот гуманизованного Fab-фрагмента в невосстанавливающих (дорожки 1–3) или в восстанавливающих (дорожки 4–6) условиях. Мембраны после переноса инкубировали либо с антителами против каппа-цепей иммуноглобулинов человека (дорожки 1 и 4), либо с антителами против гистидин-6 тага (дорожки 2 и 5), либо с антителами против каппа-цепей иммуноглобулинов мыши (дорожки 3 и 6)

манизации Fab-фрагмента антитела 1C5, что позволяет ожидать снижения иммуногенности последнего при введении в организм человека. Все вышеперечисленное указывает на то, что гуманизованный Fab-фрагмент нейтрализующего антитела 1C5 может быть использован для разработки препарата, способного заменить антирабический лошадиный или донорский иммуноглобулин для профилактики заболевания бешенством.

6. Whitelegg N.R.J., Rees A.R. // *Prot. Eng*. 2000. **13**. P. 81.
7. Couto J.R., Blank E.W., Peterson J.A., Ceriani R.L. // *Cancer Res*. 1995. **55**. N 8. P. 1717.
8. Gasser B., Maurer M., Gach J., Kunert R., Mattanovich D. // *Biotechnol. Bioeng*. 2006. **94**. N 2. P. 353.
9. Ning Ning D., Junjian X., Xunzhang W., Wenyin C., Qing Z., Kuan yuan S., Guirong R., Xiangrong R., Qingxin L., Zhouyao Y. // *J. Biochem*. 2003. **134**. N 6. P. 813.
10. Ягудин Т.А., Морозкина Е.В., Клячко Е.В., Зацепин С.С., Беневоленский С.В., Солопова О.Н., Шемчукова О.Б., Гордеевская С.Б., Борзилов А.И., Баранова Е.В., Бикетов С.Ф., Вейко В.П., Свешников П.Г. // *Молекулярная медицина* (в печати).

11. Klotz I.M. The Proteins. N.Y., 1953.
12. Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E. // Journal of Immunological Methods. 1985. **77**. P. 305.
13. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. **76**. N 9. P. 4350.
14. Laemmli U.K. // Nature. 1970. **227**. P. 680.
15. Ягудин Т.А., Марченко А.Н., Морозкина Е.В., Клячко Е.В., Зацепин С.С., Беневоленский С.В., Солопова О.Н., Шемчукова О.Б., Городецкая С.Б., Борзилов А.И., Баранова Е.В., Бикетов С.Ф., Свешников П.Г. // Молекулярная медицина (в печати).
16. Kabat E.A., Wu T.T., Reid-Miller M., Perry H.M., Gottesman K. S. // U.S. Department of Health and Human Services, NIH, Bethesda, MD. 1987.
17. Staelens S., Desmet J., Ngo T.H., Vauterin S., Pareyn I., Barbeaux P., Van Rompaey I., Stassen J.M., Deckmyn H., Vanhoorelbeke K. // Mol. Immunol. 2006. **43**. N 8. P. 1243.
18. Chothia C., Lesk A. M., Tramontano A., Levitt M., Smith-Gill S.J., Air G., Sheriff S., Padlan E. A., Davies D., Tulip W. R., Colman P. M., Spinelli S., Alzari P.M., Poljak R. J. // Nature. 1989. **342**. P. 877.
19. Kolbinger F., Saldanha J., Hardman N., Bendig M. // Prot. Eng. 1993. **6**. P. 971.
20. Tan P., Mitchell D.A., Buss T.N., Holmes M.A., Anasetti C., Foote J. // J. Immunol. 2002. **15**. **169**(2). P. 1119.
21. Carter P., Presta L., Gorman C.M., Ridgway J.B.B., Henner D., Wong W.L.T., Rowland A.M., Kottis C., Carver M.E., Shepard H.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. **89**. P. 4285.

Поступила в редакцию 20.01.10

PRODUCTION OF THE HUMANIZED Fab FRAGMENT OF THE NEUTRALIZING ANTIBODY AGAINST RABIES VIRUS

P.G. Sveshnikov, T.A. Yagudin, E.V. Morozkina, E.V. Klyachko, S.S. Zatsepin, S.V. Benevolensky, O.B. Shemchukova, L.P. Pozdnyakova, O.N. Solopova

(Chair of bioengineering, Department of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University)

The aim of the investigation is to produce functional humanized Fab fragment of the neutralizing antibody against rabies virus – a prototype of a therapeutic drug, capable of substituting the horse and the donor anti-rabies immunoglobulin. There was performed cloning and sequencing of variable light and heavy chains fragments of a high affinity neutralizing antibody against rabies virus. There was made a substitution of constant mouse fragments for human ones and a production of humanized Fab fragments in the yeast expression system. There were also investigated the immunochemical properties of the obtained Fab fragments by EIA, electrophoresis in PAAG and Western blotting. The humanized Fab fragment of the antibody against rabies virus, which exceeded the initial antibody in terms of affinity, was produced. The high humanization degree was proved with the used of the sera, specific towards human immunoglobulins. The yield of the humanized Fab fragment made up 21 mg per 1 L of the culture medium, the absence of isolated light and heavy chains of the humanized Fab fragment was testified.

Key words: *rabies virus, Fab fragment, humanization.*

Сведения об авторах: Свешников Петр Георгиевич – профессор кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, докт. биол. наук (petersveshnikov@list.ru); Ягудин Тимур Анверович – мл. науч. сотр. лаборатории оптимизации экспрессии генов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН (mitok@mail333.com); Морозкина Елена Владимировна – науч. сотр. лаборатории оптимизации экспрессии генов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, канд. биол. наук (morozkina@inbi.ras.ru); Клячко Елена Витальевна – ст. науч. сотр. лаборатории оптимизации экспрессии генов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, канд. биол. наук (eklyachko@yandex.ru); Зацепин Сергей Сергеевич – ст. науч. сотр. лаборатории оптимизации экспрессии генов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, канд. биол. наук (zatsepin@inbi.ras.ru); Беневоленский Сергей Владимирович – вед. науч. сотр. лаборатории оптимизации экспрессии генов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, канд. биол. наук (benevol@inbi.ras.ru); Шемчукова Ольга Борисовна – ст. науч. сотр. отдела биотехнологии ОАО «Всероссийский научный Центр молекулярной диагностики и лечения», канд. биол. наук (itreata@yandex.ru); Позднякова Любовь Петровна – науч. сотр. отдела биотехнологии ОАО «Всероссийский научный Центр молекулярной диагностики и лечения» (e-mail: rpl1810@inbox.ru); Солопова Ольга Николаевна – вед. науч. сотр. отдела биотехнологии ОАО «Всероссийский научный Центр молекулярной диагностики и лечения», канд. биол. наук (solopova@msn.com).