

Дослідження токсин-нейтралізуючих властивостей рекомбінантних одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіл проти субодиниці В дифтерійного токсину

О. С. Олійник, Ю. А. Лабинцев, Н. В. Короткевич,
Д. В. Колибо, С. В. Комісаренко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
Вул. Леонтовича, 9, Київ, Україна, 01601

lenaoliinyk@mail.ru

Мета. Відібрати scFv, які можуть нейтралізувати дифтерійний токсин. **Методи.** З використанням протокової цитофлуориметрії досліджено здатність специфічних scFv блокувати взаємодію міченого рецепторзв'язувального фрагмента токсину з поверхнею чутливих клітин. **Результати.** Виокремлено чотири scFv, яким притаманні властивості нейтралізувати токсин. **Висновки.** Отримані scFv можуть стати перспективними кандидатами на роль антитоксичних протидифтерійних препаратів нового покоління.

Ключові слова: антитоксини, scFv, дифтерійний токсин.

Вступ. Дія дифтерійного токсину спричиняє тяжкі ускладнення, що виникають при дифтерії, такі як ураження міокарда, поліневропатія, токсичне пошкодження печінки, нирок тощо [1]. Щоб запобігти розвитку зазначених патологій і токсичного шоку, хворим на дифтерію вводять специфічну антитоксичну сироватку коня, що інактивує дифтерійний токсин. Разом з тим, кінська сироватка сама по собі здатна викликати реакції гіперчутливості та гостру анафілаксію [2]. Тому надзвичайно важливою є розробка нових низькоімуногенних препаратів, які б забезпечували антитоксичний ефект та формували пасивний імунітет. Якщо для країн Західної Європи та Сполучених Штатів дифтерія перетворилася на екзотичну хворобу і випадки захворювання є поодинокими [3], то в Україні вона вже майже 20

років залишається серйозною проблемою для охорони здоров'я. Навіть останніми роками, коли епідемічна ситуація суттєво покращилася, випадки дифтерії продовжують зустрічатися. Отже, для України розробка нових і безпечніших протидифтерійних препаратів є особливо актуальною.

Одноланцюгові варіабельні фрагменти антитіл (scFv) – це формат рекомбінантних антитіл, у яких присутні лише варіабельні домени важкого і легкого імуноглобулінових ланцюгів, об'єднані гнучким лінкером. ScFv у порівнянні з поліклональними антитоксинами мають такі переваги, як гомогенність, специфічна активність і відносна безпечність [6].

У різних лабораторіях світу показано, що scFv з успіхом можна використовувати для нейтралізації токсинів, зокрема, токсину змії *Bothrops jararacussu* [7], альфа-нейротоксину отрути *Thai cobra* [8], Cn2-токсину отрути скорпіона [9], альфа-токсину

Clostridium perfringens [10] та ін. Раніше нами отримано низку scFv, специфічних до дифтерійного токсину [4, 5]. Метою представленої роботи було відібрати серед них такі, що володіють токсин-нейтралізуючою активністю.

Матеріали і методи. У роботі досліджували вісім scFv, відібраних з імунної та одне – з неімунної бібліотек імуноглобулінових генів миші. Усі дев'ять scFv-антитіл, за даними імунферментного аналізу, були специфічними до субодиниці В дифтерійного токсину [4, 5]. Перевіряли здатність кожного з scFv перешкоджати зв'язуванню фрагмента В дифтерійного токсину із поверхнею клітин, що містять рецептор до дифтерійного токсину. Для цього використано отриманий в нашій лабораторії злитий білок eGFP-sbB, що містить субодиницю В дифтерійного токсину та зелений флуоресцентний білок [11].

Як показано раніше, флуоресцентно мічена субодиниця В зв'язується на поверхні чутливих до токсину клітин, що можна визначити методом протокової цитофлуориметрії. При додаванні антитоксичної сироватки зв'язування фрагмента В з поверхнею клітин блокується антитілами і відповідно флуоресценція клітин зменшується. Такий підхід дозволяє оцінити протективні властивості комерційних антидифтерійних сироваток [12]. В даній роботі таку систему застосовано для перевірки здатності scFv нейтралізувати токсин.

Ми використали чутливі до дифтерійного токсину клітини лінії Vero (похідні епітеліальних клітин нирок зелених африканських мавп), отримані з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Клітини культивували на поживному середовищі RPMI-1640 з L-глутаміном, що містило 50 мг/л цефалотину та фетальну сироватку корови до кінцевої концентрації 10 % («Sigma», США).

Для забарвлення клітин до 50 мкл клітинної суспензії ($\sim 5,2 \cdot 10^5$ клітин) додавали 200 мкл буфера ЗФР–БСА– NaN_3 (0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,144 % Na_2HPO_4 , 0,024 % KH_2PO_4 , pH 7,4, 0,1 % NaN_3 , 1 % бичачого сироваткового альбуміну), який містив 2 мкг флуоресцентно міченої субодиниці В (eGFP-sbB, молекулярная маса ~ 70 кДа). NaN_3 вносили,

щоб запобігти ендоцитозу флуоресцентно міченої субодиниці В. Клітини інкубували протягом 30 хв за температури 4 °C, після чого двічі відмивали від незв'язаної eGFP-sbB 1 мл буфера ЗФР–БСА– NaN_3 , ресуспендували в 1 мл ЗФР–БСА– NaN_3 та вимірювали інтенсивність флуоресценції за допомогою протокового цитофлуориметра EPICS XL («Beckman Coulter», США).

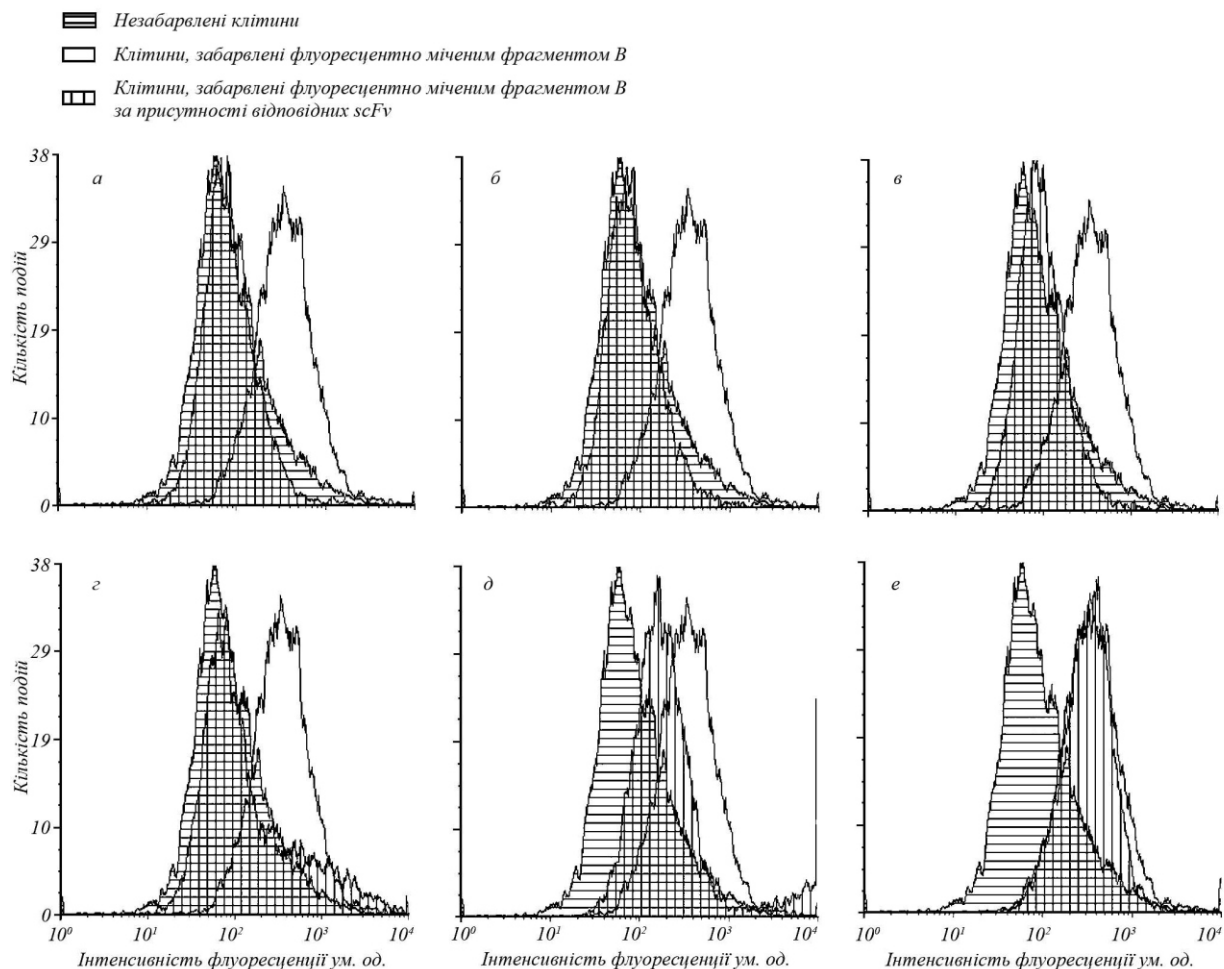
Для визначення властивостей scFv-антитіл нейтралізувати токсин флуоресцентно мічену субодиницю В перед забарвленням клітин інкубували протягом 1 год за присутності 10-разового молярного надлишку відповідних scFv ($\sim 33\text{--}35$ кДа).

Як позитивний контроль використовували пробу з eGFP-sbB без scFv-антитіл. Для негативного контролю клітини готували так само, як і інші проби, але без додавання eGFP-sbB чи scFv-антитіл.

Результати і обговорення. З дев'яти досліджених scFv-антитіл чотири перешкоджали, одне частково інгібувало, а чотири інших – не були здатні запобігати зв'язуванню токсину з поверхнею клітин, які мають відповідний рецептор.

На рисунку наведено гістограми інтенсивності флуоресценції клітин Vero, оброблених флуоресцентно міченим В-фрагментом токсину і scFv-антитілами. Як видно, антитіла scFv П-15 (константа афінності до субодиниці В, $K_a = 1,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$), scFv30 ($K_a = 5,42 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$), scFv42 ($K_a = 6,71 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) та scFv120 ($K_a = 1,1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$) повністю блокували зв'язування eGFP-sbB з поверхнею клітин. ScFv П-15 отримано з неімунної бібліотеки, три інших scFv-антитіла – з імунної бібліотеки імуноглобулінових генів миші. Антитіло scFv51 ($K_a = 3,98 \cdot 10^8$), також виділене з імунної бібліотеки, лише частково перешкоджало зв'язуванню. І, навпаки, антитіло scFv94 ($K_a = 2,08 \cdot 10^8$) не інгібувало зв'язування. Таким чином, не знайдено кореляції між величиною константи афінності до В субодиниці (визначеної раніше [4, 5]) та здатністю антитіла блокувати її зв'язування з рецептором до дифтерійного токсину, що свідчило про різну епітопну специфічність досліджених антитіл.

У роботі наведено результати, отримані при використанні scFv-антитіл, афінно виділених з продуцентів на основі штаму *Escherichia coli* Rosetta та вектора pET-22b. Аналогічні результати одержано



Гістограми флуоресценції, які характеризують здатність відібраних клонів scFv запобігати зв'язуванню флуоресцентно міченого В-фрагмента дифтерійного токсину з клітинами Vero: а – scFv30; б – scFv42; в – scFv120; г – scFv II-15; д – scFv51; е – scFv94

при тестуванні периплазматичних екстрактів продуцентів цих же дев'яти scFv-антитіл, але на основі штаму *E. coli* HB2151 та вектора *pCANTAB-5E*.

Нейтралізуюча активність антитіл може бути пов'язана з їхньою здатністю блокувати зв'язування В-фрагмента дифтерійного токсину з рецептором, порушувати роботу Т-домену (цей домен також знаходиться в В-субодиниці і відповідає за транслокацію каталітичного фрагмента до цитозолу клітин-мішеней) або інгібувати каталітичну активність А-фрагмента [13–16]. Використані нами підходи орієнтовані на відбір scFv, антитоксична функція яких реалізується через блокування рецепторзв'язувального сайту. Такі антитіла впливають на найпершу стадію взаємодії токсину з клітиною-мішенню і, отже, якоюсь мірою є ефективнішими, ніж антитіла, специфічні до інших ділянок токсину.

Отримані дані свідчать про те, що серед відібраних раніше В-специфічних антитіл майже половина спрямована проти сайту зв'язування токсину з рецептором. Вірогідно, це пов'язано з тим, що зазначений сайт розташований на С-кінці молекули токсину (амінокислотні залишки 482–535) і є високоімуногенним.

Таким чином, у результаті роботи нами відібрано чотири scFv антитіла з потенційною здатністю нейтралізувати дифтерійний токсин. Зважаючи на низку ознак, таких як відносно низька алергенність, отримання у різних системах експресії, можливість модифікації ДНК-послідовності для заміни або додавання певних амінокислотних мотивів та ін., scFv є надзвичайно привабливими кандидатами на роль антитоксичних протидифтерійних реагентів, що їх можна було б застосовувати для пасивної імуні-

зації. Особливо актуальними такі препарати могли б стати для хворих, попередньо сенсibilізованих сироваткою (адже кінські антисироватки вводять не лише при лікування дифтерії), та людей з підвищеною чутливістю до сироватки коня.

O. S. Oliinyk, A. J. Labyntsev, N. V. Korotkevich, D. V. Kolibo, S. V. Komisarenko

Study on toxin-neutralization properties of recombinant single-chain variable antibody's fragments against diphtheria toxin B subunit

Summary

Aim. To select scFv which have an ability to neutralize diphtheria toxin. **Methods.** Flow-cytometry was used to study the ability of specific scFv to block the binding of a labeled receptor binding fragment of toxin with a surface of sensitive to toxin cells. **Results.** Four scFv with toxin-neutralization properties were selected. **Conclusions.** The obtained scFv could be considered as promising candidates for antitoxic antidiphtheria drugs of new generation.

Keywords: antitoxins, scFv, diphtheria toxin.

Е. С. Олейник, Ю. А. Лабынцев, Н. В. Короткевич, Д. В. Колибо, С. В. Комисаренко

Исследование токсин-нейтрализующих свойств рекомбинантных одноцепочечных вариабельных фрагментов антител против субъединицы В дифтерийного токсина

Резюме

Цель. Отобрать scFv со способностью нейтрализовать дифтерийный токсин. **Методы.** С использованием проточной цитофлуориметрии исследована возможность специфических scFv блокировать взаимодействие меченого рецепторсвязывающего фрагмента токсина с поверхностью чувствительных клеток. **Результаты.** Выбраны четыре scFv со свойствами нейтрализовать токсин. **Выводы.** Полученные scFv могут стать перспективными кандидатами на роль антитоксических противодифтерийных препаратов нового поколения.

Ключевые слова: антитоксины, scFv, дифтерийный токсин.

PERELIK LITERATURI

1. Supotnitsky M. V. Microorganisms, toxins and epidemics.– М., 2000.–376 р.
2. Emiroglu N. Diphtheria situation in the European region of WHO. WHO recommendations on control, treatment and management of diphtheria // CMACH.–2001.–3, N 3.–P. 274–279.
3. Mattos-Guaraldi A. L., Moreira L. O., Damasco P. V., Junior R. H. Diphtheria remains a threat to health in the developing world – an overview // Mem. Inst. Oswaldo Cruz.–2003.–98, N 8.–P. 987–993.
4. Oliinyk O. S., Kaberniuk A. A., Burkaleva D. O., Romaniuk S. I., Kolibo D. V., Shepelyakovskaya A. O., Laman A. G., Komisarenko S. V. Obtaining of recombinant scFv-antibodies

against diphtheria toxin using phage display system // Ukr. Biochem. J.–2007.–79, N 5.–P. 50–56.

5. Oliinyk O. S., Kaberniuk A. A., Redchuk T. A., Korotkevich N. V., Labyntsev A. J., Romaniuk S. I., Kolibo D. V., Komisarenko S. V. Construction of immune library of murine immunoglobulin genes and screening of single-chain Fv-antibodies to diphtheria toxin B subunit // Ukr. Biochem. J.–2009.–81, N 2.–P. 60–71.
6. Aubrey N., Muzard J., Juste M., Billiald P. Recombinant antibodies: towards a new generation of antivenoms? // J. Soc. Biol.–2006.–200, N 4.–P. 345–354.
7. Tamarozzi M. B., Soares S. G., Marcussi S., Giglio J. R., Barbosa J. E. Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom // Biochim. Biophys. Acta.–2006.–1760, N 9.–P. 1450–1457.
8. Kulkeaw K., Sakolvaree Y., Srimanote P., Tongtawe P., Maneewatch S., Sookrung N., Tungtrongchitr A., Tapchaisri P., Kurazono H., Chaicumpa W. Human monoclonal ScFv neutralize lethal *Thai cobra, Naja kaouthia*, neurotoxin // J. Proteomics.–2009.–72, N 2.–P. 270–282.
9. Riano-Umbarila L., Juarez-Gonzalez V. R., Olamendi-Portugal T., Tongtawe P., Maneewatch S., Sookrung N., Tungtrongchitr A., Tapchaisri P., Kurazono H., Chaicumpa W. A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom // FEBS J.–2005.–272, N 10.–P. 2591–2601.
10. Zhao B. H., Xu C. B. Cloning and expression of ScFv gene against alpha-toxin of *Clostridium perfringens* type A // Chin. J. Bacteriol.–2001.–17, N 5.–P. 543–547.
11. Kaberniuk A. A., Labyntsev A. J., Kolibo D. V., Oliinyk O. S., Redchuk T. A., Korotkevich N. V., Gorchev V. F., Karakhim S. O., Komisarenko S. V. Fluorescent derivatives of diphtheria toxin's subunit b and their interaction with vero cells // Ukr. Biochem. J.–2009.–81, N 1.–P. 68–78.
12. Kaberniuk A. A., Oliinyk O. S., Kolibo D. V., Komisarenko S. V. Toxin-neutralizing properties of antibodies to diphtheria toxin recombinant subunits A and B and new method for toxin-neutralizing evaluation // Ukr. Biochem. J.–2009.–81, N 3.–P. 93–102.
13. Zaitsev E. M., Sviridov V. V., Titova N. G., Lebedev V. S., Garipova M. I. Antitoxic properties of monoclonal antibodies against diphtheria toxin // Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.–1985.–2.–P. 37–41.
14. Zucker D. R., Murphy J. R. Monoclonal antibody analysis of diphtheria toxin I. Localization of epitopes and neutralization of cytotoxicity // Mol. Immunol.–1984.–21, N 9.–P. 785–793.
15. Collier R. J. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century // Toxicon.–2001.–39, N 11.–P. 1793–1803.
16. Usuwanthim K., Pootong A., Chaisri U., Tongtawe P., Tapchaisri P., Chongsa-Nguan M., Chaicumpa W. Murine monoclonal antibodies neutralizing the cytotoxic activity of diphtheria toxin // Asian. Pac. J. Allergy Immunol.–2008.–26, N 1.–P. 47–55.

УДК 591.145.4

Надійшла до редакції 15.05.09