



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C07K 16/08 (2006.01); C07K 2317/56 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015157143, 31.12.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.12.2015

Дата регистрации:
21.12.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 31.12.2015

(43) Дата публикации заявки: 06.07.2017 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 21.12.2017 Бюл. № 36

Адрес для переписки:

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1,
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Фонд "Национальное
интеллектуальное развитие"

(72) Автор(ы):

Алиев Теймур Кантамирович (RU),
Боков Максим Николаевич (RU),
Дементьева Ирина Григорьевна (RU),
Долгих Дмитрий Александрович (RU),
Кирпичников Михаил Петрович (RU),
Панина Анна Алексеевна (RU),
Позднякова Любовь Петровна (RU),
Свешников Петр Георгиевич (RU),
Шемчукова Ольга Борисовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ)
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 6630144 B1, 07.10.2003. WO
2015127136 A2, 27.08.2015. RU 2395577 C1,
27.07.2010. RU 2395576 C1, 27.07.2010.

(54) **МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО, СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С ГЛИКОПРОТЕИНОМ ВИРУСА ЭБОЛА, ФРАГМЕНТЫ ДНК, КОДИРУЮЩИЕ УКАЗАННОЕ АНТИТЕЛО, И АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к моноклональному антителу, селективно связывающему гликопротеин вируса Эбола с константой диссоциации комплекса $1,8 \times 10^{-9} \text{M}$, а также изолированным фрагментам ДНК, кодирующим участки легкой и тяжелой цепи указанного антитела, и антигенсвязывающему фрагменту вышеуказанного моноклонального антитела.

Специфичность моноклонального антитела к гликопротеину вируса Эбола подтверждена методами иммуоферментного анализа и иммуноблоттинга. Установлены аминокислотная и нуклеотидная последовательности переменных доменов моноклонального антитела. Изобретение позволяет получить новые моноклональные антитела, селективно связывающие гликопротеин вируса Эбола. 4 н.п. ф-лы, 4 ил., 2 табл., 3 пр.

RU
2 639 533
C2

RU
2 639 533
C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 16/08 (2006.01); C07K 2317/56 (2006.01)(21)(22) Application: **2015157143, 31.12.2015**(24) Effective date for property rights:
31.12.2015Registration date:
21.12.2017

Priority:

(22) Date of filing: **31.12.2015**(43) Application published: **06.07.2017** Bull. № 19(45) Date of publication: **21.12.2017** Bull. № 36

Mail address:

119991, Moskva, GSP-1, Leninskie gory, 1,
Moskovskij gosudarstvennyj universitet imeni M.V.
Lomonosova, Fond "Natsionalnoe intellektualnoe
razvitiie"

(72) Inventor(s):

**Aliev Tejmur Kantamirovich (RU),
Bokov Maksim Nikolaevich (RU),
Dementeva Irina Grigorevna (RU),
Dolgikh Dmitrij Aleksandrovich (RU),
Kirpichnikov Mikhail Petrovich (RU),
Panina Anna Alekseevna (RU),
Pozdnyakova Lyubov Petrovna (RU),
Sveshnikov Petr Georgievich (RU),
Shemchukova Olga Borisovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Moskovskij gosudarstvennyj
universitet imeni M.V. Lomonosova" (MGU)
(RU)**

(54) **MONOCLONAL ANTIBODY, BINDING WITH EBOLA VIRUS GLYCOPROTEIN, DNA FRAGMENTS CODING THIS ANTIBODY, AND ANTIGEN-BINDING FRAGMENT**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to a monoclonal antibody selectively binding the Ebola virus glycoprotein with a dissociation constant of the complex $1.8 \times 10^{-9} \text{M}$, as well as isolated DNA fragments encoding the light and heavy chain regions of the said antibody, and an antigen-binding fragment of the above monoclonal antibody. The specificity of the monoclonal

antibody to the Ebola virus glycoprotein was confirmed by immunoassay and immunoblotting. The amino acid and nucleotide sequences of the variable domains of the monoclonal antibody are determined.

EFFECT: invention allows preparation of new monoclonal antibodies selectively binding the Ebola virus glycoprotein.

4 cl, 4 dwg, 2 tbl, 3 ex

RU
2 639 533
C 2

RU
2 639 533
C 2

Область техники

Изобретение относится к биотехнологии и биохимии, а именно к получению моноклонального антитела, связывающегося с гликопротеином вируса Эбола.

Предшествующий уровень техники

5 Впервые вирус Эбола (EBOV) появился в 1976 г. в Судане и Демократической республике Конго (в то время - Заир). Первоначальные вспышки не были массовыми, но привлекли к себе внимание из-за высокого уровня смертности, достигающего до 90%. Новый вариант вируса Эбола появился весной 2014 г. в Гвинее, где ранее такого заболевания не наблюдалось (Baize S., Pannetier D., Oestereich L. et al. Emergence of Zaire
10 Ebola virus disease in Guinea // N. Engl. J. Med. 2014. Vol. 371. N15. P. 1418-1425). Несмотря на усилия международных организаций, эпидемия лихорадки Эбола распространилась на Сьерра-Леоне, Либерию и Нигерию.

В течение последних 10 лет было предложено несколько подходов для лечения лихорадки Эбола. Внутривенное введение ингибиторов коагуляции крови, таких как
15 рекомбинантный человеческий активированный белок C (Geisbert T.W., Young H.A., Jahrling P.B., Davis K.J., Kagan E., Hensley L.E. Mechanisms underlying coagulation abnormalities in ebola hemorrhagic fever: overexpression of tissue factor in primate monocytes/
macrophages is a key event // J. Infect. Dis. 2003. Vol. 188. N11. P. 1618-1629), повышает выживаемость на 18%. Другим подходом является использование синтетических
20 антисмысловых аналогов олигонуклеотидов, образующих дуплексы со специфическими РНК вирусов (Geisbert T.W., Hensley L.E., Jahrling P.B., Larsen T., Geisbert J.B., Paragas J., Young H.A., Fredeking T.M., Rote W.E., Vlasuk G.P. Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor: a study in rhesus monkeys // Lancet. 2003. Vol. 362. N9400. P. 1953-1958). Внутривенное введение малых интерферирующих РНК привело
25 к повышению выживаемости в интервале от 66% до 100% в зависимости от количества инъекций (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., Nichols D.K., Iversen P.L., Bavari S. Advanced antisense therapies for postexposure protection against lethal filovirus infections // Nat. Med. 2010. Vol. 16. N9. P. 991-994). Однако необходимо подчеркнуть, что все
30 вышеописанные методы требуют начала лечения в течение первых 30-60 мин от момента заражения.

Разработка средств антителотерапии в отношении вируса Эбола проводится с 1990-х годов. Из 8 белков вируса ключевой мишенью для средств иммунотерапии является вирусный гликопротеин (GP), являющийся решающим фактором патогенности. Этот
35 белок находится на поверхности вирусного капсида и служит для прикрепления вируса и слияния с мембраной. GP подвергается пост-трансляционному расщеплению и образует две субъединицы, связанные дисульфидной связью: GP1 и GP2. Субъединица GP1 отвечает за прикрепление вируса к клеткам хозяина, а GP2 влияет на слияние мембран вируса и клетки (Volchkov V.E., Feldmann H., Volchkova V.A., & Klenk H.D. Processing of the Ebola
40 virus glycoprotein by the proprotein convertase furin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. N10. P. 5762-5767). GP является центральным компонентом вакцин, а также мишенью для нейтрализующих антител и ингибиторов присоединения и слияния (Lee J E, Saphire E O. Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry // Future Virol. 2009. Vol. 4. N6. P. 621-635).

45 Вместе с тем, в опытах на приматах было показано, что в отличие от использования различных неспецифических средств противовирусной терапии пассивная иммунизация антителами позволяет добиться терапевтического эффекта при введении через 24 ч после инфицирования [Olinger G.G., Pettitt J., Kim D. et al. Delayed treatment of Ebola virus

infection with plant-derived monoclonal antibodies provides protection in rhesus macaques // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. Vol. 109. N44. P. 18030-18035; Qiu X., Audet J., Wong G. et al. Successful treatment of Ebola virus-infected cynomolgus macaques with monoclonal antibodies // Sci. Transl. Med. 2012. Vol. 4. N138. P. 138ra81).

5 Известны моноклональные антитела к гликопротеину вируса Эбола (US 6,630,144 B1), характеризующиеся уникальной аминокислотной последовательностью и тем, что они нейтрализуют вирус Эбола и связываются с эпитопами гликопротеина.

10 Известны моноклональные антитела к гликопротеину вируса Эбола и их антиген-связывающие фрагменты (WO 2015/127136 A2), характеризующиеся уникальной аминокислотной последовательностью. Описаны 7 антител, из которых CAN9G1 узнает муциновый домен гликопротеина вируса Эбола и обладает выраженным защитным эффектом на летальной мышинной модели.

Раскрытие изобретения

15 Задачей настоящего изобретения было получение моноклонального антитела, способного к связыванию с гликопротеином вируса Эбола и отличающегося по аминокислотной последовательности вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей от известных из предшествующего уровня техники моноклональных антител к белкам вируса Эбола. А также получение изолированных фрагментов ДНК, кодирующих участки легкой и тяжелой цепи указанного антитела и антигенсвязывающего фрагмента 20 указанного моноклонального антитела.

Техническим результатом является получение нового моноклонального антитела мыши IgG1-изотипа, способного к связыванию с гликопротеином вируса Эбола и характеризующегося константой диссоциации комплекса антиген-антитело 1,8 нМ.

25 Также техническим результатом является расширение арсенала средств аналогичного назначения, а именно получение нового моноклонального антитела к белкам вируса Эбола.

30 Поставленная задача решается получением моноклонального антитела, селективно связывающего гликопротеин вируса Эбола, включающего вариабельный участок тяжелой цепи (VH) указанного антитела, содержащего последовательность аминокислот, не менее чем на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1, а вариабельный участок легкой цепи (VL) указанного антитела содержит последовательность аминокислот, не менее чем на 90% гомологичную SEQ ID NO: 2.

35 Поставленная задача решается также тем, что установлен изолированный фрагмент ДНК, кодирующий VH указанного антитела с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3.

Поставленная задача решается также тем, что получен изолированный фрагмент ДНК, кодирующий VL указанного антитела с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 4.

40 Поставленная задача решается также тем, что получен антигенсвязывающий фрагмент указанного моноклонального антитела, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи (VH) указанного антитела с последовательностью аминокислот, не менее чем на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1 (фиг. 1), и вариабельный участок легкой цепи (VL) указанного антитела с последовательностью аминокислот, не менее чем на 90% гомологичную SEQ ID NO: 2 (фиг. 1).

45 Моноклональное антитело, селективно связывающее гликопротеин вируса Эбола, настоящего изобретения характеризуется тем, что вариабельный участок тяжелой цепи (VH) указанного антитела содержит:

(i) CDR1 с последовательностью аминокислот GYTFTSYV из SEQ ID NO: 1;

- (ii) CDR2 с последовательностью аминокислот INPYNDGT из SEQ ID NO: 1;
- (iii) CDR3 с последовательностью аминокислот ARGRGHYYAYVFDY из SEQ ID NO:

1.

При этом вариабельный участок легкой цепи (VL) указанного антитела содержит

- (i) CDR1 с последовательностью аминокислот SSVSY из SEQ ID NO: 2;
- (ii) CDR2 с последовательностью аминокислот DTS из SEQ ID NO: 2;
- (iii) CDR3 с последовательностью аминокислот QQWSSNPPT из SEQ ID NO: 2.

Моноклональное антитело получено путем иммунизации мышей Balb/C конъюгатом рекомбинантного GP вируса Эбола с микобактериальным белком теплового шока HSP65, получением и селекцией линий гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к рекомбинантному GP вируса Эбола, анализа аффинности и специфичности отобранного МоАт, определения нуклеотидной и аминокислотной последовательности его вариабельных доменов.

Антитела обычно состоят из двух тяжелых цепей, связанных между собой дисульфидными связями, и легких цепей, ассоциированных с N-концом каждой из тяжелых цепей. Каждая тяжелая цепь содержит на N-конце вариабельный домен с константным доменом на другом конце. Каждая легкая цепь содержит на N-конце вариабельный домен с константным доменом на другом конце. Вариабельные домены каждой пары легкой и тяжелой цепей образуют антигенсвязывающий участок.

Вариабельные домены легкой и тяжелой цепей обладают похожей общей структурой, и каждый домен включает каркас из четырех участков, последовательности которых являются относительно консервативными, связанных посредством трех участков, определяющих комплементарность (complementarity determining regions, CDRs). Четыре каркасных участка формируют конформацию типа бета-складчатого слоя. Участки CDRs расположены в близком соседстве друг с другом благодаря каркасным участкам и вносят вклад в образование антигенсвязывающего участка. Участки CDRs и каркасные участки антител могут быть определены путем ссылки на нумерационную систему Кабата (Kabat numbering system, Kabat et al., 1987 "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office) в сочетании с данными рентгеноструктурного анализа, как указано в заявке WO 91/09967. Участки CDRs и каркасные участки антител могут также быть определены по номенклатуре Международной информационной системы по иммуногенетике (International Immunogenetics Information System, www.imgt.org).

Для получения антитела, которое может связываться с каким-либо специфическим антигеном, обычно используют методику Kohler и Milstein (Kohler et al., (1976) Nature 256:495-497). Моноклональные антитела получают путем слияния клеток селезенки из иммунизированного животного и клеток миеломы с получением гибридомы. Гибридомы могут быть проверены на способность к продукции нужного антитела, затем гибридомы могут быть выращены, из них могут быть выделены указанные антитела. Термин «выращенные клетки», использованный здесь, означает гибридомы или другие линии клеток, которые производят антитела. Методы получения и проверки таких выращенных клеток описаны Harlow и др. (Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1988). Получение материала, использующегося в качестве антигена, для инъекции животных включают в себя методики, хорошо известные из уровня техники, например использование полноразмерного белка, использование пептида, выбранного из иммуногенных участков белка, а также любыми другими методами, известными из уровня техники. Смотрите Harlow и др. (см. выше).

Подходящий способ для выделения антител, эффективных для использования в

рамках настоящего изобретения, включает (а) назначение животному эффективного количества белка или пептида с целью получения антител, (b) выделение указанных антител, (c) определение последовательности антител.

Для повышения эффективности иммунизации и качества получаемых моноклональных антител был получен иммуноконъюгат рекомбинантного гликопротеина вируса Эбола GP и микобактериального белка теплового шока HSP65.

Затем провели иммунизацию мышей Balb/c полученным конъюгатом по двум вариантам - в подушечки задних лапок и внутрибрюшинно. Полученные лимфоциты гибридизовали с клетками миеломы SP2/0. Тестирование супернатантов гибридом проводили методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием биотинилированного GP. Все первичные культуры, показавшие активность в ИФА, были клонированы методом предельных разведений. Были отобраны группы клонов - потомков одной первичной культуры. Клетки каждого из субклонов были наработаны в культуре в количестве, достаточном для получения асцитных жидкостей.

Моноклональные антитела, выделенные из асцитной жидкости, сравнивали методом непрямого ИФА, по результатам которого было отобрано антитело GPE118.

Затем определяли субзотип полученного антитела, оценивали специфичность и иммунореактивность полученного антитела методом иммуноблоттинга и ИФА с биотинилированным антигеном в растворе. Была определена константа диссоциации моноклонального антитела GPE118.

Далее клонировали и секвенировали последовательности кДНК, кодирующих переменные домены мышинового антитела GPE118 к гликопротеину вируса Эбола. Для этого была выделена суммарная РНК из клеток гибридом, проведена реакция обратной транскрипции-амплификации. Полученные фрагменты ДНК клонировали и секвенировали. Результаты секвенирования ДНК различных клонов сравнивали между собой и с базами данных GeneBank (IgBlast). В результате были найдены нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 3 (фиг. 1) и SEQ ID NO: 4 (фиг. 1), на основании которых была определена аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 переменных доменов указанного антитела. Участки CDRs были определены по номенклатуре Международной информационной системы по иммуногенетике (International Immunogenetics Information System, www.imgt.org).

В частности, антителом согласно настоящему изобретению является моноклональное антитело, обладающее способностью к связыванию рекомбинантного гликопротеина вируса Эбола.

Таким антителом является антитело, содержащее последовательность аминокислот, не менее чем на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1, в качестве переменного участка тяжелой цепи (VH) указанного антитела, последовательность аминокислот, не менее чем на 90% гомологичную SEQ ID NO: 2, в качестве переменного участка легкой цепи (VL) указанного антитела, и консервативные участки обеих цепей, необходимых для функционирования указанного антитела. Такое новое гуманизованное антитело селективно связывается с гликопротеином вируса Эбола. Консервативные участки тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина IgG, IgM, IgA, IgD или IgE могут быть использованы в качестве консервативных участков для тяжелой цепи согласно настоящему изобретению. Консервативные участки легкой цепи человеческого иммуноглобулина каппа или лямбда могут быть использованы в качестве консервативных участков для легкой цепи антитела согласно настоящему изобретению.

В настоящем изобретении термин "антитело" использован для описания иммуноглобулинов или их фрагментов, мономеров или димеров легкой цепи или тяжелой

цепи, одноцепочечных антител, таких как одноцепочечные антитела Fv's, в которых переменные домены тяжелой и легкой цепей соединены пептидным линкером, а также как природных, так и полученных методами рекомбинантных ДНК или другим образом, при условии, что антитело содержит по крайней мере один антигенсвязывающий участок.

5 Остальная часть антитела не должна обязательно включать только последовательность, производную от иммуноглобулина. Например, может быть сконструирован ген, в котором часть цепи, последовательность ДНК, кодирующая часть цепи человеческого иммуноглобулина, соединена с последовательностью ДНК, кодирующей последовательность аминокислот полипептида эффектора или молекулы-репортера.

10 Используемый в настоящем документе термин «антитело» предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, составленных из четырех полипептидных цепей, при этом две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи связываются друг с другом дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно называемую в настоящем документе VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно называемую в настоящем документе VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена: CL. Области VH и VL могут далее подразделяться на области гиперпеременности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), перемежаемые областями с более высоким уровнем консервативности, называемыми каркасными областями (FR). Каждая область VH и VL образована тремя CDR и четырьмя FR, расположенными от аминотерминального конца к карбокситерминальному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

25 В настоящем изобретении фраза "антитело, обладающее способностью к связыванию с рекомбинантным GP вируса Эбола», означает молекулу, которая связывается с GP и образует стабильный комплекс. Способность антитела к связыванию с антигеном может быть определена специалистом в данной области с использованием методов, включающих, но не ограничивающихся методом иммуноферментного анализа (ИФА),

30 равновесным диализом, с использованием плазмон-поверхностного резонанса. Методы определения аффинности хорошо известны специалисту в данной области техники, подробно описаны Janeway и др. (Immunobiology: The Immune System in Health and Disease (Garland Publishing Company, 1996)).

Изолированным фрагментом ДНК, кодирующим антитело, согласно настоящему изобретению является фрагмент ДНК, кодирующий переменные легкую или тяжелую цепь моноклонального антитела, селективно связывающего гликопротеин вируса Эбола, содержащего последовательность аминокислот, не менее чем на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1, и последовательность аминокислот, не менее чем на 90% гомологичную SEQ ID NO: 2.

40 Ввиду вырожденности трансляционного кода могут быть различия в последовательности ДНК. Фрагменты ДНК согласно настоящему изобретению не ограничены фрагментами, показанными в SEQ ID NO: 3 или 4, при условии, что они кодируют участки цепей антитела, содержащего последовательность аминокислот, не менее чем на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1, и последовательность аминокислот, не менее чем на 90% гомологичную SEQ ID NO: 2.

Используемый в настоящем документе термин «антигенсвязывающая область» антитела обозначает один или несколько фрагментов антитела, которые сохраняют способность к специфическому связыванию с антигеном. К примерам связывающих

фрагментов, включенных в термин «антигенсвязывающая область» антитела, относятся (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, бивалентный фрагмент, состоящий из двух фрагментов Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH отдельной области антитела; (v) фрагмент dAb (Ward et al. (1989) Nature 241:544-546), состоящий из домена VH; и (vi) отдельная определяющая комплементарность область (CDR). Более того, несмотря на то, что два домена в фрагменте Fv, VL и VH кодируются различными генами, их можно объединить, используя рекомбинантные технологии, посредством синтетического линкера, который позволяет построить из них единую белковую цепочку, в которой области VL и VH связываются с образованием моновалентных молекул (известных как одиночная цепь Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также включаются в сферу охвата термина «антигенсвязывающая область» антитела.

Краткое описание чертежей

На Фиг. 1 показаны аминокислотные (SEQ ID NO: 1 и 2) и нуклеотидные (SEQ ID NO: 3 и 4) последовательности МоАт GPE118.

На Фиг. 2 показана гель-электрофореграмма МоАт GPE118 в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) и β-меркаптоэтанола; М - белковые маркеры молекулярного веса, 1 - МоАт GPE118.

На Фиг. 3 показан иммуноблот рекомбинантного GP вируса Эбола, окрашенный с помощью МоАт GPE118; М - белковые маркеры молекулярного веса, 1 - МоАт GPE118; 2 - контрольное антитело Ru52; 3 - контроль антивидового пероксидазного конъюгата.

На Фиг. 4 показано расположение участков CDRs в варибельном домене легкой GPE118L и тяжелой GPE118H цепей МоАт GPE118. Участки CDRs подчеркнуты.

Осуществление изобретения

Последующие примеры приведены для целей объяснения и не ограничивают каким-либо образом рамки настоящего изобретения.

Ранее было показано, что конъюгирование рекомбинантных антигенов с микобактериальными белками теплового шока (*M. tuberculosis* HSP65) существенно повышает их иммуногенность, и в результате иммунизации мышей линии Balb/c позволяет получать высокоаффинные МоАт, направленные против эпитопов природных белков (Свешников П.Г., Малайцев В.В., Киселев В.И. Роль белков теплового шока в развитии реакций врожденного иммунитета, Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, №5, 2007, стр. 108-117; Свешников П.Г., Малайцев В.В., Киселев В.И., Функции белков теплового шока в системе адаптивного иммунитета.

Конструирование вакцин, Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, №6, 2007, стр. 96-106; P. Sveshnikov and V. Kiselev, "METHODS, KITS AND COMPOSITIONS FOR THE DEVELOPMENT AND USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO ANTIGENS OF LOW IMMUNOGENICITY", PCT/RU2004/000373, Filing date: 24.09.2004).

Пример 1. Получение мышинового моноклонального антитела против гликопротеина вируса Эбола

Для приготовления иммуноконъюгатов рекомбинантный гликопротеин вируса Эбола GP (IBT Bioservices, США) и HSP65 диализовали против 0.1М натрий фосфатного буфера pH 6.8 в течение ночи на холоду. Микобактериальный HSP65 активировали добавлением аденозиндифосфата в смеси с MgCl₂ до концентрации 1 мМ и инкубировали при температуре 37°C 1 ч. Активированный HSP65 (150 мкг, 2 нмоль) добавляли к 50 мкг

(0.8 нмоль) GP и инкубировали на шейкере с перемешиванием при комнатной температуре в течение 3 ч. Образовавшиеся комплексы фиксировали путем добавления глутарового альдегида до концентрации 0.05% (объем/объем) и инкубировали 30 мин при температуре 37°C. Останавливали реакцию добавлением глицина до концентрации 0,1 М. Инкубировали на шейкере при комнатной температуре 30 мин, а затем полученные конъюгаты переводили в фосфатно-солевой буфер (ФСБ) при помощи диализа. Степень конъюгирования иммуногенов проверяли методом электрофореза в 10% SDS-PAGE.

Для иммунизации были взяты 2 двухмесячные мыши линии Balb/c. Одной из них вводили иммуноконъюгат HSP65-GP в подушечки задних лапок. Другой вводили иммуноконъюгат внутрибрюшинно. Иммуноген готовили следующим образом: по 20 мкг конъюгата на мышь доводили до объема 50 мкл с помощью ФСБ, затем добавляли равный объем адъюванта Фройнда и суспендировали до образования однородной эмульсии. Для первой иммунизации использовали полный адъювант Фройнда, для второй иммунизации, проводимой на 14 день по той же схеме, - неполный. Через два дня после второй иммунизации мыши, которым антиген вводился в подушечки лапок, были забиты, и спленоциты из подколенных лимфоузлов использованы для гибридизации с клетками мышинной миеломы. Финальная иммунизация оставшейся мыши была проведена через две недели после второй внутрибрюшинно конъюгатом HSP65-GP в ФСБ. Через два дня после заключительной иммунизации мыши были забиты для извлечения соответствующих клеток.

Полученные лимфоциты гибридизовали с клетками миеломы SP2/0 по стандартной методике с использованием 50% ПЭГ 4000 (Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature. 1975. Vol. 256. N5517. P. 495-497). Клетки высевали в 96-луночные культуральные планшеты (по 6 планшетов на каждую гибридизацию) в ростовой среде DMEM с добавлением фетальной бычьей сыворотки до концентрации 8%, L-глутамин, пирувата, гентамицина, а также гипоксантина, тимидина и аминоптерина (НАТ) в концентрациях, рекомендованных производителями добавок (полная селективная ростовая среда). Рост клеточных колоний оценивали визуально при помощи микроскопа. В большинстве лунок 96-луночных планшетов наблюдали рост 1-2 первичных культур на седьмой-десятый день после гибридизации. От каждой гибридизации было получено около 4000 НАТ-устойчивых первичных культур. Тестирование супернатантов гибридом проводили методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием биотинилированного GP. Биотинилирование GP проводили при помощи активированного эфира биотина в соотношении биотин/GP в реакционной смеси равном 15:1.

Моноклональные антитела нарабатывали в асцитных жидкостях мышей линии Balb/c. Асцитные жидкости получали введением 1 млн гибридных клеток в перитонеальную полость мышей линии BALB/c. Мышам предварительно за неделю до введения клеток внутрибрюшинно вводили пристан по 0,5 мл на мышь. Через 11-14 сут после введения клеток собирали асцитную жидкость.

Результаты титрования в непрямом ИФА асцитов группы клонов, условно обозначенной GPE 1XX, представлены в Таблице 1. На основании полученных данных был отобран клон GPE118.

45

Результаты титрования в непрямом ИФА асцитов группы клонов GPE 1XX

| Разведение асцита | GPE 103 | GPE 106 | GPE 108 | GPE 111 | GPE 112 | GPE 113 | GPE 114 | GPE 115 | GPE 116 | GPE 117 | GPE 118 |
|-------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1000 | 0,298 | 0,315 | 0,315 | 0,32 | 0,427 | 0,368 | 0,398 | 0,333 | 0,398 | 0,383 | 0,412 |
| 3000 | 0,327 | 0,393 | 0,430 | 0,386 | 0,405 | 0,365 | 0,391 | 0,234 | 0,374 | 0,361 | 0,418 |
| 9000 | 0,321 | 0,373 | 0,417 | 0,343 | 0,349 | 0,32 | 0,37 | 0,103 | 0,318 | 0,281 | 0,395 |
| 27000 | 0,301 | 0,361 | 0,302 | 0,331 | 0,273 | 0,165 | 0,311 | 0,084 | 0,137 | 0,12 | 0,307 |
| 81000 | 0,132 | 0,182 | 0,268 | 0,248 | 0,206 | 0,092 | 0,12 | 0,086 | 0,089 | 0,085 | 0,292 |
| 243000 | 0,072 | 0,064 | 0,119 | 0,102 | 0,094 | 0,093 | 0,091 | 0,085 | 0,092 | 0,087 | 0,146 |

Субизотип антитела определяли методом ИФА с использованием коммерческих антисывороток в соответствии с рекомендациями производителя (Набор для изотипирования Mouse Typer Isotyping Panel #1722055, Bio-Rad, США). Было установлено, что моноклональное антитело из клона гибридомы GPE 118 относится к IgG1-изотипу. Одноименное антитело выделяли из асцитной жидкости методом аффинной хроматографии на белок G-сефарозе (GE Healthcare, США) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем, и переводили диализом в ФСБ. Степень чистоты МоАт контролировали при помощи электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) и β -меркаптоэтанола в ступенчатой буферной системе Лэммли (SDS-PAGE) (Фиг. 2), а также при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе «АКТА explorer/purifier/basic» (GE Healthcare, США) в режиме гель-фильтрации с использованием колонки Superdex 200 (1×40 см). По данным электрофореза, в восстанавливающих условиях на геле присутствуют 2 полосы, соответствующие тяжелой и легкой цепям иммуноглобулина мыши IgG1-изотипа.

Пример 2. Анализ мышинового моноклонального антитела против гликопротеина вируса Эбола.

Для определения специфичности и иммунореактивности мышинового МоАт против вируса Эболы изучали способность его связывания с антигеном в растворе с использованием биотинилированного GP вируса Эбола. Для этого в 96-луночный планшет с высокой связывающей способностью (Corning-Costar, Нидерланды, кат. номер 9018) сорбировали 5 мкг/мл мышинового МоАт GPE118 в ФСБ при 4°C в течение ночи. Планшет 5 раз промывали ФСБ с 0,05% Твин-20. Затем вносили конъюгат GP-биотин в ФСБ с 2% БСА в раститровке от 1 мкг/мл до 0,3 нг/мл, инкубировали 1 ч при 37°C, промывали 5 раз ФСБ с 0,05% Твин-20. Следующая стадия - инкубация с ЭкстрАвидин-пероксидазой в концентрации 0,15 мкг/мл (ФСБ, 2% БСА) в течение 1 ч при 37°C. Для проявления реакции лунки промывали 5 раз ФСБ с 0,05% Твин-20 и вносили по 100 мкл ТМБ субстрат (3,3,5,5-Тетраметил-бензидин), инкубировали 15 мин при комнатной температуре на шейкере. Реакцию останавливали 0,5 М H₂SO₄ и определяли оптическую плотность при длине волны 450 нм. Результаты связывания МоАт GPE118 с биотинилированным GP вируса Эбола представлены в Таблице 2.

Таблица 2

Связывание МоАт GPE118 с биотинилированным GP вируса Эбола

| GP -биотин, нг/мл | GPE118 |
|-------------------|--------|
| 1000 | 2.937 |
| 300 | 2.591 |
| 100 | 1.158 |
| 30 | 0.428 |
| 10 | 0.170 |
| 3 | 0.077 |
| 1 | 0.035 |
| 0.3 | 0.023 |

Исследование показало наличие специфического связывания GPE118 с GP в растворе.

Для подтверждения специфичности полученного МоАт GPE118 использовали метод иммуноблоттинга. На первом этапе проводили электрофоретическое разделение антигена GP вируса Эбола в 12%-ном полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях. Затем осуществляли электрофоретический перенос (электроблоттинг) белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану (Membrane filters cellulose nitrate; pore size 0,45 μ m, S045A330R, Advantec MFS, Inc., США). Перенесенные белки выявляли на нитроцеллюлозной мембране с помощью непрямого ИФА (иммуноблот). Для этого мембрану блокировали раствором 5%-ного казеина в PBS в течение ночи при +4°C и трижды промывали буфером ФСБ, содержащим 0,05% Tween 20. Нитроцеллюлозную мембрану разрезали на полоски, помещали в раствор антител GPE118 и Ru 52 (антитело против Rubella virus в качестве отрицательного контроля) - по 100 мкг/мл, инкубировали 1 ч при +37°C. После трехкратной промывки полоски инкубировали с антивидовым пероксидазным конъюгатом антител против IgG мыши в течение 1 ч при 37°C. После повторной трехкратной промывки в ФСБ, содержащим 0,05% Tween 20, добавляли субстрат 3,3-диаминобензидин, 4-хлор-1-нафтол и перекись водорода, инкубировали от 4 до 10 мин и останавливали реакцию, промывая полоски водой (Фиг. 3). По данным иммуноблота, GPE118 интенсивно взаимодействует с полноразмерной молекулой GP 94 кДа и с его фрагментом с молекулярной массой ~67 кДа, что подтверждает специфичность МоАт GPE118 к гликопротеину вируса Эбола.

Константы диссоциации МоАТ определяли в соответствии с методикой, предложенной Klotz I.M. (The Proteins. Ed. H. Neurath and K. Bailey Academic Press, New York. 1953. V. 1. P. 727) с модификациями из B. Friguet и др. (B. Friguet et. al. Measurements of the True Affinity Constant in Solution of Antigen-Antibody Complex by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Journal of Immunological Methods, 77 (1985) 305-319). На первом этапе проводят инкубацию МоАт в постоянной концентрации 1 нМ (150 нг/мл) с антигеном GP в диапазоне концентраций 0.1-10 нМ (10-1000 нг/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре с постоянным перемешиванием на шейкере для достижения

термодинамического равновесия в трехкомпонентной системе: свободный антиген, свободное антитело и комплекс антиген-антитело. На втором этапе осуществляют измерение концентрации свободных антител методом твердофазного ИФА с иммобилизованным на планшет GP. На заключительном этапе рассчитывают Кд по

уравнению Клотца:

$$A_0/A_0-A=1+1/a \text{ Кд,}$$

где A_0 - оптическая плотность, измеренная для антител в отсутствии антигена;

A - оптическая плотность, измеренная для свободных антител в смеси антиген-антитело;

a - концентрация антигена.

Для МоАт GPE118 значение константы диссоциации комплекса антиген-антитело составило 1,8 нМ.

Пример 3. Клонирование и секвенирование последовательностей кДНК, кодирующих переменные домены мышинового антитела GPE118 к гликопротеину вируса Эбола

Гены переменных доменов легкой и тяжелой цепей МоАТ GPE118 были получены с помощью реакции обратной транскрипции-амплификации тотальной РНК GPE118.

РНК выделяли из $1-2 \times 10^6$ клеток гибридомы GPE118 с помощью реагента Trizol (Life Technologies, США) согласно рекомендуемому производителем протоколу. Обратную транскрипцию проводили, применяя обратную транскриптазу MMuLV (Евроген, Россия) и олиго(dT₁₈)-праймер. Полученную кДНК амплифицировали с помощью ДНК-полимеразы Tersus (Евроген, Россия) с использованием набора праймеров, комплементарных областям константных доменов МоАт:

SMRibo 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCrGrGrG

RT-КАР 5'-GAGTCAGCACACGAAGAАСТТG

NesG 5'-CAGGGGCCAGTGGATAGAC

Полученные ПЦР-фрагменты длиной 600-650 п.о. клонировали в вектор pALT2 (Евроген, Россия) и отбирали не менее 10 положительных клонов как для легкой, так и для тяжелой цепи МоАТ, после чего с помощью секвенирования определяли нуклеотидные последовательности, кодирующие переменные фрагменты. Затем проводили сравнение нуклеотидных последовательностей с помощью программ Chromas, CLC Sequence Viewer и GeneBee. В результате анализа были определены консенсусные нуклеотидные последовательности переменных доменов тяжелой (SEQ ID NO: 3) и легкой (SEQ ID NO: 4) цепей МоАт GPE118. На их основании с учетом трансляционного кода были определены аминокислотные последовательности переменных доменов тяжелой (SEQ ID NO: 1) и легкой (SEQ ID NO: 2) цепей МоАт GPE118. Для подтверждения достоверности определения аминокислотных последовательностей МоАт GPE118 был проведен масс-спектрометрический анализ фрагментов трипсинового гидролиза легких и тяжелых цепей исходного моноклонального МоАт GPE118. Полученные последовательности оценивали с помощью сравнения с гомологичными последовательностями, находящимися в базе данных GeneBank (IgBlast), что подтвердило их принадлежность к генам переменных доменов тяжелой и легкой цепи антител *Mus musculus*. Участки CDRs VL и VH (фиг. 4) были определены по номенклатуре Международной информационной системы по иммуногенетике (International Immunogenetics Information System, www.imgt.org).

Таким образом, были получены аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, а также нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

(57) Формула изобретения

1. Моноклональное антитело, селективно связывающее гликопротеин вируса Эбола, включающее переменный участок тяжелой цепи (VH) указанного антитела, содержащий последовательность аминокислот, не менее чем на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1, а переменный участок легкой цепи (VL) указанного антитела содержит последовательность аминокислот, не менее чем на 90% гомологичную SEQ ID NO: 2.

2. Изолированный фрагмент ДНК, кодирующий VH антитела по п. 1, с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3.

3. Изолированный фрагмент ДНК, кодирующий VL антитела по п. 1, с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 4.

4. Антигенсвязывающий фрагмент моноклонального антитела по п. 1, селективно связывающий гликопротеин вируса Эбола, содержащий переменный участок тяжелой цепи (VH) указанного антитела с последовательностью аминокислот, не менее чем на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1, и переменный участок легкой цепи (VL) указанного антитела с последовательностью аминокислот, не менее чем на 90% гомологичную SEQ ID NO: 2.

20

25

30

35

40

45

**МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО,
СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С ГЛИКОПРОТЕИНОМ
ВИРУСА ЭБОЛА, ФРАГМЕНТЫ ДНК,
КОДИРУЮЩИЕ УКАЗАННОЕ АНТИТЕЛО И
АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ**

M.V. Lomonosov Moscow State University

> SEQ ID NO:1

> 122

> PRT

> Natural sequence

> VH fragment of heavy chain of monoclonal antibody GPE118 to Ebola virus glycoprotein

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSDKSSS
TAFMELSSLTSEDSAVYYCARGRHHYAYVFDYWGQGTTLTVSSA

> SEQ ID NO:2

> 106

> PRT

> Natural sequence

> VH fragment of light chain of monoclonal antibody GPE118 to Ebola virus glycoprotein

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPARFSGSGSGTSYSLTISSM
EAEDAATYYCQQWSSNPPTFGAGTKLELK

> 3 (SEQ ID NO:3 - VH gene of heavy chain of monoclonal antibody GPE118 to Ebola virus glycoprotein, murine, DNA)

> DNA

> Mouse Balb/c

>

> (1)..(363)

< ? >

1 GAGGTCCAGC TGACAGAGTC TGGACCTGAG CTGGTAAAGC CTGGGGCTTC AGTGAAGATG

1

61 TCCTGCAAGG CTTCTGGATA CACATTCACT AGCTATGTTA TGCACTGGGT GAAGCAGAAG
 121 CCTGGGCAGG GCCTTGAGTG GATTGGATAT ATTAATCCTT ACAATGATGG TACTAAGTAC
 181 AATGAGAAGT TCAAAGGCAA GGCCACACTG ACTTCAGACA AATCCTCCAG CACAGCCTTC
 241 ATGGAGCTCA GCAGCCTGAC CTCTGAGGAC TCTGCGGTCT ATTACTGTGC AAGAGGGAGG
 301 GGCATTACT ACGCCTACGT TTTTGACTAC TGGGGCCAAG GCACCACTCT CACAGTCTCC
 361 TCA

> 4 (SEQ ID NO:4 - VL gene of light chain of monoclonal antibody GPE118 to Ebola virus glycoprotein, murine, DNA)

> DNA

> Mouse Balb/c

>

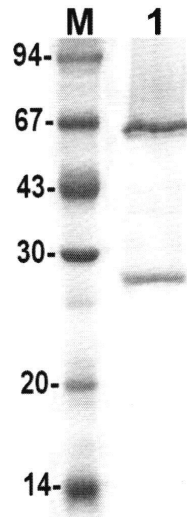
> (1)..(336)

< ? >

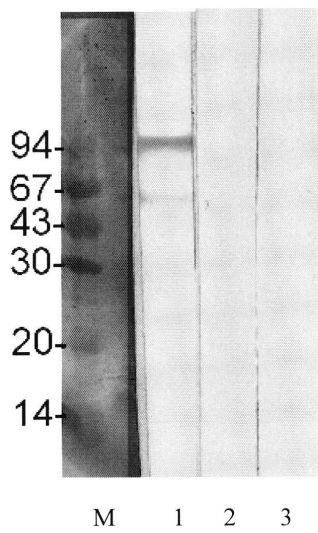
1 GATGTTGTGA TGACCCAAAC TCCACTCTCC CTGCCTGTCA GTCTTGGAGA TCAAGCCTCC
 61 ATGTCTTGCA GATCTAGTCA GAGCCTTGTA CACAGTAATG GAAACACCTA TTTACATTGG
 121 TACCTGCAGA AGCCAGGCCA GTCTCCAAAG CTCTGATCT ACAAAGTTTC CAACCGATTT
 181 TCTGGGGTCC CAGACAGGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTTAC ACTCAAGATC
 241 AGCAGAGTGG AGGCTGAGGA TCTGGGAGTT TATTTCTGCT CTCAAAGTAC ACATGTTCCC
 301 TACACGTTTCG GAGGGGGGAC CAAGCTGGAA ATAAAA

Фиг. 1

**МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО,
СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С ГЛИКОПРОТЕИНОМ
ВИРУСА ЭБОЛА, ФРАГМЕНТЫ ДНК,
КОДИРУЮЩИЕ УКАЗАННОЕ АНТИТЕЛО И
АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ**



Фиг. 2



Фиг. 3

3

**МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО,
СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С ГЛИКОПРОТЕИНОМ
ВИРУСА ЭБОЛА, ФРАГМЕНТЫ ДНК,
КОДИРУЮЩИЕ УКАЗАННОЕ АНТИТЕЛО И
АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ**

| | | | | |
|-----------|---------------------------------------|------------------------------|------------------|-------------------------|
| GPE 118 H | EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCAS | CDR1 <u>GYTFTSYV</u> | MHWVKQKPGGLEWIGY | CDR2 <u>INPYNDGT</u> |
| GPE 118 H | KYNEKFKGKATLTSKSSSTAFMELSSLTSEDSAVYYC | CDR3 <u>ARGRGHYAYVFDY</u> | WGQGTTLTVSS | |
| GPE 118 L | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSAS | CDR1 <u>SSVSY</u> | MHWYQKSGTSPKRWIY | CDR2 <u>DTS</u> |
| GPE 118 L | KLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYC | CDR3 <u>QQWSSNPPT</u> | FGAGTKLELK | |

Фиг. 4