



УДК 579.852.11'112.083.3 : 577.27.1'1

## МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К БОТУЛИНИЧЕСКИМ НЕЙРОТОКСИНАМ ТИПОВ А, В, Е И F

© 2011 г. С. Г. Аббасова\*, Н. В. Руденко\*\*#, А. Ю. Гороховатский\*, М. В. Капралова\*\*, И. Д. Виноградова\*\*\*, Ю. В. Вертиев\*\*\*, В. А. Несмеянов\*\*\*\*, Е. В. Гришин\*\*\*\*

\*Филиал Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, г. Пущино, просп. Науки, 6;

\*\*Пущинский государственный университет, Пущино;

\*\*\*Научно-исследовательский институт микробиологии и эпидемиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва;

\*\*\*\*Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 30.09.2010 г. Принята к печати 18.10.2010 г.

Получены и охарактеризованы мышинные моноклональные антитела к угрожающим здоровью человека ботулиническим нейротоксинам (BoNTs) типов А, В, Е и F, способные взаимодействовать с токсином в составе соответствующего природного токсического комплекса. На основе антител разработан метод сэндвич-ELISA для количественной детекции ботулотоксинов. Пределы детекции предложенных тест-систем: для BoNTs А, В, Е и F составляют 0,4, 0,5, 0,1 и 2,4 нг/мл. Разработанный метод количественно выявляет BoNTs в мясных и овощных консервах. Два антитела – BNТА-4.1 и BNТА-9.1, как по отдельности, так и в смеси обладают способностью нейтрализовать действие природного ботулинического токсического комплекса типа А *in vivo*, при этом смесь антител нейтрализует более высокую дозу токсина. Показано, что антитело BNТА-4.1 специфично связывается с легкой (каталитической) цепью, а антитело BNТА-9.1 взаимодействует с тяжелой цепью токсина. Мы полагаем, что моноклональные антитела BNТА-4.1 и BNТА-9.1 могут быть перспективны для разработки на их основе терапевтических антител для экстренной помощи при ботулизме, вызванном BoNT/A.

*Ключевые слова:* ботулизм, ботулинические нейротоксины А, В, Е и F, моноклональные антитела, получение, сэндвич-ELISA, нейтрализация токсина.

### ВВЕДЕНИЕ

Ботулинические нейротоксины (BoNTs), секретируемые спорообразующими облигатными анаэробными микроорганизмами *Clostridium botulinum*, обладают экстремальной токсичностью и относятся к агентам биотеррористической угрозы первостепенной опасности [1–3]. Бактерии *C. botulinum* могут проникать в организм через пищевой тракт (пищевой ботулизм) и поврежденные кожные покровы (травматический ботулизм), известны также случаи младенческого ботулизма.

Ботулинические нейротоксины – гетеродимерные белки с молекулярной массой 150 кДа, состоящие из тяжелой (H, 100 кДа) и легкой (L<sub>C</sub>, 50 кДа) цепей, соединенных одной дисульфидной связью. H-Цепь состоит из H<sub>C</sub>-домена (50 кДа),

связывающегося с акцепторами пресинаптической мембраны, и H<sub>N</sub>-домена (50 кДа), ответственного за транслокацию токсина из эндосомы в цитоплазму [4–7]. Легкие или каталитические цепи всех ботулинических токсинов являются металлопротеиназами и расщепляют белки, входящие в состав SNARE-комплекса, ответственного за процесс экзоцитоза нервными окончаниями, посредством которого осуществляется выброс ацетилхолина в синаптическую щель [8–10]. Механизм действия токсинов связан с блокадой высвобождения нейромедиатора ацетилхолина в мионевральных синапсах и с прерыванием прохождения нервного импульса. Блокада экзоцитоза в окончаниях моторных нейронов носит необратимый характер, что приводит к мышечному параличу, включая паралич диафрагмы, и, в тяжелых случаях, к смерти.

В естественных условиях BoNTs существуют в составе стабильных комплексов с другими белками (гемагглютинаинами), с которыми они связаны нековалентными связями. Было показано, что гемагглютинины, входящие в состав комплекса,

Сокращения: BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E, BoNT/F – ботулинические нейротоксины А, В, Е и F; FCS – эмбриональная телячья сыворотка; PBS – фосфатно-солевой раствор; PBST – PBS с 0,1% Твин-20; МА – моноклональные антитела; MLD – минимальная летальная доза; ELISA – иммуноферментный анализ.

# Автор для связи (тел.: 8 (4967) 73-06-53; эл. почта: rudenko@fibkh.serpukhov.su).

связываются преимущественно с  $H_C$ -доменом токсинов [11].

Состав и масса токсических комплексов могут варьировать в зависимости от метода выделения. Существование в комплексе защищает ботулотоксины от агрессивной среды желудка при пищевой интоксикации и увеличивает их время жизни в кровотоке, а возможно, и усиливает сродство к пресинаптическим мембранам нейронов, тем самым значительно снижает летальную дозу токсина при оральном и парентеральном попадании токсина в организм [12].

Ботулинические нейротоксины серологически подразделяются на типы А, В, С, D, Е, F и G, все они чрезвычайно токсичны, но естественную угрозу для людей представляют токсины серотипов А, В, Е и F (BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E и BoNT/F соответственно). За последние 20 лет вспышки пищевого ботулизма у человека чаще всего были обусловлены токсином типа А, затем BoNT/B и BoNT/E. Реже причиной болезни бывает BoNT/F. Примерно в 15% случаев установить тип токсина не удается. Нейтрализующая способность поликлональной антитоксикановой сыворотки в отношении соответствующего ботулинического токсина не является перекрестной, поэтому для успешной пассивной терапии ботулизма крайне важно определить тип токсина, вызвавшего заболевание.

Разработка экспресс-методов детекции BoNTs остается актуальной проблемой как для медицины, так и для органов государственного санитарно-эпидемиологического контроля, вследствие их экстремальной токсичности и самой высокой летальности при пищевых отравлениях. Кроме этого, в последнее время во всем мире внимание к данной категории токсинов возросло из-за угрозы биотерроризма. Среди современных экспресс-методов детекции ELISA по-прежнему сохраняет ведущие позиции как высоко воспроизводимый, наиболее простой в исполнении и не требующий дорогостоящего оборудования.

“Золотым” стандартом среди разработанных методов детекции ботулинических токсинов долгие годы неизменно оставался, хотя длительный и дорогой, но наиболее чувствительный тест с использованием лабораторных животных. Одна минимальная летальная доза (MLD), определяемая в тесте с использованием белых беспородных мышей (несколько десятков пикограммов токсина на 1 мл), долгое время оставалась недостижимым пределом детекции для большинства предлагаемых иммуноферментных методов. Именно поэтому эффективность методов детекции BoNTs, разработанных на основе различных современных технологий, сравнивают с эффективностью их определения в тесте с использованием мышей,

а пределы детекции токсинов этими методами также выражают в MLD [13–15].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Получение и характеристика моноклональных антител к ботулиническим нейротоксином типов А, В, Е, F.** Вследствие чрезвычайной токсичности ботулинических токсинов мышей линии BALB/c иммунизировали соответствующими анатоксинами, полученными обработкой соответствующих ботулинических нейротоксинов раствором формальдегида. Этот подход позволил нам достичь высокого уровня иммунного ответа животных, необходимого для проведения успешной гибридизации. Анатоксины вводили внутрибрюшинно по 20 мкг на мышь в полном и неполном адьювантах Фрейнда с интервалом в 2 недели. Титры сывороток крови иммунных животных проверяли с помощью ELISA с использованием сорбированных нативных холотоксинов, титры составляли от 1 : 100000 до 1 : 1000000. Гибридизацию спленоцитов мышей с миеломной линией SP2/0 осуществляли по стандартной методике с помощью полиэтиленгликоля [16]. Отбор гибридом, продуцирующих специфичные антитела, проводили непрямой ELISA с использованием иммобилизованных нативных холотоксинов. Одиночные клоны получали клонированием методом лимитирующих разведений. В результате были получены гибридомы, секретирующие МА против BoNTs типов А, В, Е, F. МА нарабатывали в асцитной жидкости мышей BALB/c, для чего мышам, предварительно получившим инъекцию пристана, вводили внутрибрюшинно гибридомы по  $1 \times 10^6$  клеток на мышь.

Антитела из асцитной жидкости мышей выделяли аффинной хроматографией на белок-А-сефарозе или ионообменной хроматографией на колонке MonoQ. Содержание иммуноглобулинов в препаратах, оцененное с помощью электрофореза, составляло не менее 95%, выход МА — не менее 1 мг на 1 мл асцитной жидкости.

Все полученные антитела охарактеризованы. Были определены их константы связывания с антигеном по методу Битти и соавт. [17]. На рис. 1 представлен стандартный график для определения константы аффинности на примере антитела BNTA-4.1. Были определены типы тяжелых и легких цепей, а также способность МА взаимодействовать с денатурированной формой соответствующего токсина и специфичность в отношении тяжелой или легкой субъединиц токсинов методом иммуноблоттинга. Характеристики МА, не обладающих перекрестной иммунореактивностью с другими ботулиническими нейротоксинами, представлены в табл. 1. Все полученные антитела имели высокую константу взаимодействия с нейротоксинами и были способны выявлять как нативные холотоксины в методе ELISA, так и их

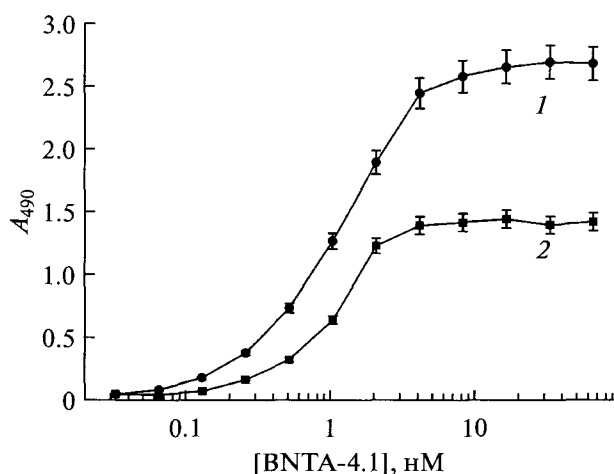


Рис. 1. График титрования антитела BNTA-4.1 для определения его константы аффинности по методу Битти и соавт. [17] при загрузке по токсину 50 (1) и 20 (2) нг/лунка.

денатурированные формы в Вестерн-блот-анализе. Единственным исключением было лишь антитело BNTB-10, которое не взаимодействовало с BoNT/V в иммуноблоттинге, что свидетельствует о том, что данное антитело направлено против конформационно-зависимой антигенной детерминанты белка.

Таким образом, нами были получены представительные панели МА против каждого типа ботулинических токсинов (А, В, Е и F). Несомненным преимуществом использования МА является высокая воспроизводимость результатов исследований, поскольку, в отличие от поликлональных, МА характеризуются стабильными иммунохимическими свойствами.

**Определение нейтрализующей активности антител к BoNT/A.** В табл. 2 представлены данные о нейтрализующей активности только 5 специфичных к BoNT/A антител, т.е. тех, которые не обладали перекрестной иммунореактивностью с другими нейротоксинами. Свойство антител к BoNT/A нейтрализовать действие токсина *in vivo* было проверено с использованием белых беспородных мышей сначала на смеси всех полученных против BoNT/A МА. После выявления способности смеси нейтрализовать дозу 15 MLD токсического комплекса типа А (определение MLD см. "Эксперимент. часть") исследовали нейтрализующую активность каждого из полученных антител. Анализ результатов проведенных экспериментов показал, что только антитела BNTA-4.1 и BNTA-9.1 обладали нейтрализующей активностью, причем смесь этих двух антител нейтрализовала гораздо более высокую дозу токсического комплекса BoNT/A, чем каждое из антител в отдельности, что отражает синергичность их действия в этом тесте (табл. 2).

Таблица 1. Характеристика моноклональных антител против ботулинических нейротоксинов

Название антитела	Типы тяжелой и легкой цепей	Константа аффинности, M <sup>-1</sup>	Специфичность
BNTA-2.1	IgG1 (κ)	1.5 × 10 <sup>8</sup>	Н-цепь BoNT/A
BNTA-4.1	IgG1 (κ)	4.1 × 10 <sup>9</sup>	Л-цепь BoNT/A
BNTA-5.3	IgG1 (κ)	5.5 × 10 <sup>9</sup>	Н-цепь BoNT/A
BNTA-7.1	IgG1 (κ)	7.5 × 10 <sup>8</sup>	Н-цепь BoNT/A
BNTA-9.1	IgG1 (κ)	8.3 × 10 <sup>8</sup>	Н-цепь BoNT/A
BNTB-3	IgG1 (κ)	6.2 × 10 <sup>9</sup>	Н-цепь BoNT/B
BNTB-4	IgG1 (κ)	2.3 × 10 <sup>9</sup>	Н-цепь BoNT/B
BNTB-5	IgG1 (κ)	4.1 × 10 <sup>9</sup>	Н-цепь BoNT/B
BNTB-9	IgG1 (κ)	3.1 × 10 <sup>9</sup>	Н-цепь BoNT/B
BNTB-10	IgG1 (κ)	4.8 × 10 <sup>8</sup>	Конформационная детерминанта BoNT/B
BNTE-4	IgG1 (κ)	4.1 × 10 <sup>9</sup>	Н-цепь BoNT/E
BNTE-5	IgG2a (κ)	4.9 × 10 <sup>8</sup>	Н-цепь BoNT/E
BNTE-8	IgG1 (κ)	4.8 × 10 <sup>9</sup>	Н-цепь BoNT/E
BNTE-9	IgG1 (κ)	3.1 × 10 <sup>9</sup>	Н-цепь BoNT/E
BNTE-10	IgG2b (λ)	5.9 × 10 <sup>7</sup>	Н-цепь BoNT/E
BNTE-11	IgG2a (κ)	6.3 × 10 <sup>7</sup>	Н-цепь BoNT/E
BNTE-12	IgG1 (κ)	9.3 × 10 <sup>8</sup>	Н-цепь BoNT/E
BNTF-2	IgG1 (κ)	4.1 × 10 <sup>9</sup>	Л-цепь BoNT/F
BNTF-4	IgA (κ)	7.5 × 10 <sup>8</sup>	Н-цепь BoNT/F

Таблица 2. Нейтрализующая *in vivo*-активность моноклональных антител к ботулиническому токсину типа А

Токсический комплекс BoNT/A, вводимая доза	Вводимое МА*	Количество животных, взятых в эксперимент/погибших
15 MLD	—	4/4
	Антисыворотка типа А, 100 МЕ	4/0
	BNTA-2.1	4/4
	BNTA-4.1	4/0
	BNTA-5.1	4/4
	BNTA-7.1	4/4
	BNTA-9.1	4/0
30 MLD	BNTA-4.1	4/0
	BNTA-9.1	4/4
500 MLD	BNTA-4.1 + BNTA-9.1	4/0
1000 MLD	BNTA-4.1 + BNTA-9.1	4/0
1500 MLD	BNTA-4.1 + BNTA-9.1	4/0
2000 MLD	BNTA-4.1 + BNTA-9.1	4/4

\* Каждое МА вводилось в количестве 10 мг.

В иммуноблоттинге нейтрализующее антитело BNTA-4.1 связывалось с легкой цепью, а BNTA-9.1 — с тяжелой цепью токсина, что и объясняет синергизм их действия в тесте нейтрализации *in vivo*.

В работе Адекара и соавт. [18] было описано моноклональное антитело, взаимодействующее с легкой цепью BoNT/A, которое нейтрализовало действие токсина как *in vivo*, так и *in vitro*. При этом было показано, что нейтрализующий эффект данного антитела обусловлен его способностью проникать внутрь клетки, ингибировать ферментативную активность легкой цепи токсина и тем самым препятствовать расщеплению SNAP-25. Были также описаны рекомбинантные антитела к тяжелой цепи BoNT/A, которые эффективно нейтрализовали действие токсина *in vivo*, блокируя проникновение в нейроны циркулирующего в крови токсина, но данные антитела были не способны ингибировать действие токсина, уже проникшего в нервные окончания [19].

Мы полагаем, что полученные нами антитела BNTA-9.1 и BNTA-4.1 могут быть перспективны для разработки на их основе препарата для экстренной терапии при ботулизме, вызванном BoNT/A. Учитывая литературные данные о нейтрализующей активности BNTA-4.1 *in vivo*, направленность его действия против ферментативной активности BoNT/A не исключена. Возможно, это антитело способно нейтрализовать каталитическую активность токсина в окончаниях моторных нейронов. В отношении нейтрализующего МА BNTA-9.1, связывающегося с тяжелой цепью, можно предположить, что оно способно препятствовать проникновению в клетки-мишени свободно циркулирующего токсина.

**Подбор пар антител и характеристика тест-систем для определения нейротоксинов типов А, В, Е, F в формате сандвич-ELISA.** Тест-системы для детекции ботулинических нейротоксинов были разработаны нами в формате сандвич-ELISA, в основе которого лежит использование двух МА к разным эпитомам токсина, достаточно удаленным друг от друга, что позволяет двум разным антителам к этим эпитомам одновременно взаимодействовать с молекулой токсина.

Для подбора пар антител к соответствующему токсину проводили биотинилирование всех иммуноглобулинов с помощью N-оксисулфинимидного эфира биотина, и биотинилированные антитела использовали как антитела детекции, а антитела, иммобилизованные на планшетах, — для “захвата” токсина. Были проверены все возможные сочетания из полученных МА против соответствующих типов ботулинических токсинов и определены пары антител, дающие максимальное соотношение сигнал/фон при концентрации токсина 100 нг/мл. Для каждого подобранного сандвич-ELISA была определена минимальная детектируемая концентрация токсина, для чего делали последовательные двукратные разведения токсинов от 100.0 до 0.01 нг/мл (рис. 2). Нижним пределом детекции, определяемым тест-системой, считали концентрацию токсина, соответствующую значению оптического поглощения при длине волны 490 нм, достоверно превышающую показатель фонового поглощения тест-системы плюс два стандартных отклонения. Результаты этих исследований сведены в табл. 3. Интересно отметить, что в случае пар МА, детектирующих комплексы ботулинических токсинов типов А и F, антитела детекции (BNTA-4.1

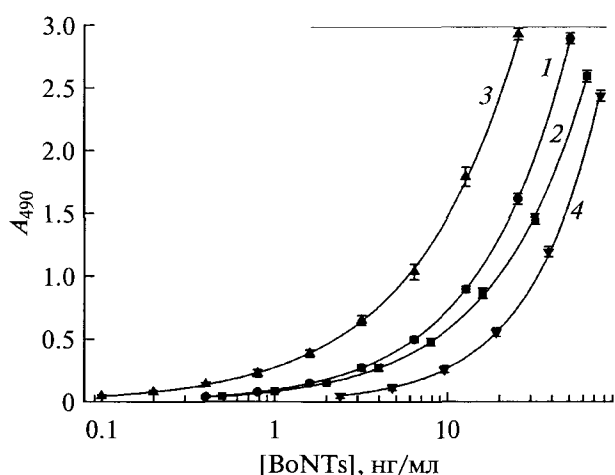


Рис. 2. Калибровочные кривые для определения концентрации ботулинических токсинов BoNT/A, BoNT/B, BoNT/E, BoNT/F методом сэндвич-ELISA с помощью пар специфических МА: BNTA-9.1–BNTA-4.1bio (1), BNTB-5–BNTB-3bio (2), BNTE-8–BNTE-4bio (3), BNTF-4–BNTF-2bio (4).

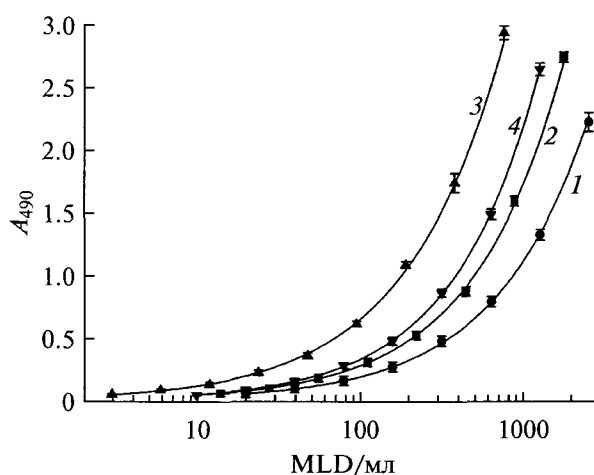


Рис. 3. Титрование сред культивирования соответствующих штаммов-продуцентов методом сэндвич-ELISA с помощью пар моноклональных антител: BNTA-9.1–BNTA-4.1bio (1), BNTB-5–BNTB-3bio (2), BNTE-8–BNTE-4bio (3), BNTF-4–BNTF-2bio (4).

и BNTF-2) взаимодействовали с легкой субъединицей соответствующих токсинов, обладающей каталитической активностью, а антитела “захвата” (BNTA-9.1 и BNTF-4) узнавали тяжелые цепи токсинов. В то же время антитела, составившие сэндвич-ELISA для детекции ботулинических нейротоксинов типов В и Е, взаимодействовали только с тяжелой цепью токсина (табл. 1).

Поскольку BoNTs в естественных условиях существуют в составе стабильных комплексов с гемагглютинидами, часть антигенных детерминант может быть недоступна для взаимодействия с антителами. Поэтому было важно понять, могут ли разработанные нами тест-системы детектировать природные токсины в составе токсических комплексов. С этой целью мы определяли содержание природных токсинов в среде культивирования соответствующих штаммов-продуцентов

*C. botulinum* (рис. 3). Содержание токсических ботулинических комплексов в среде культивирования штаммов-продуцентов *C. botulinum* оценивали в MLD с использованием белых беспородных мышей. Среды культивирования содержали по 500 000 MLD /мл – для токсических комплексов типа А и В и по 100 000 MLD/мл – для Е и F. Проведенная серия испытаний подтвердила возможность применения разработанных тест-систем для детекции ботулинических нейротоксинов в составе природных токсических комплексов и позволила определить пределы детекции этих тест-систем в MLD (табл. 3). Таким образом, в результате было разработано шесть тест-систем для количественной детекции ботулинических токсинов типов А, В, Е и F. Пределы детекции MLD разработанных нами тест-систем в формате сэндвич-ELISA с использованием пероксидазы хрена

Таблица 3. Характеристика пар моноклональных антител для количественного определения ботулинических нейротоксинов

Нейротоксин	Сэндвич-ELISA*	Линейный диапазон определения, нг/мл	Предел детекции нейротоксина	
			нг/мл	MLD/мл
BoNT/A	BNTA-9.1 – BNTA-4.1bio	0.4–40	0.4	20
BoNT/B	BNTB-5 – BNTB-3bio	0.5–50	0.5	14
	BNTB-9 – BNTB-4bio	0.5–50	0.5	14
	BNTB-3 – BNTB-9bio	0.5–50	0.5	14
BoNT/E	BNTE-4 – BNTE-8bio	0.1–25.0	0.1	3
	BNTE-8 – BNTE-4bio	0.1–25.0	0.1	3
BoNT/F	BNTF-4 – BNTF-2bio	2.4–50.0	2.4	10

\* Первым указано антитело “захвата”, вторым – антитело детекции.

Таблица 4. Определение ботулинических нейротоксинов в пищевых продуктах

Внесенный нейротоксин	Пищевой продукт	Определяемое количество токсина, % от внесенного*
BoNT/A	Мясной паштет	69 ± 2
BoNT/A	Морковное пюре	52 ± 3
BoNT/B	Мясной паштет	78 ± 1
BoNT/B	Морковное пюре	57 ± 4
BoNT/E	Паштет из печени	63 ± 2
BoNT/E	Сайра консервированная без добавления масла	40 ± 3
BoNT/F	Паштет из печени	61 ± 3
BoNT/F	Сайра консервированная без добавления масла	68 ± 3

\* Представлены средние значения, полученные в линейном диапазоне кривых титрования.

и *o*-фенилендиамина, оцененные в MLD, были сравнимы с аналогичными показателями тест-систем, описанными в литературе [20, 21], но уступали по чувствительности определения летальному биологическому тесту с применением лабораторных мышей.

Как известно, чувствительность тест-систем, основанных на применении антител, определяется не только аффинностью антител, но и степенью амплификации детектирующего сигнала, которая, в свою очередь, зависит как от природы используемого субстрата, так и от формата тестов. Формат иммуно-ПЦР, сочетающий иммунную реакцию антиген-антитело с полимеразной цепной реакцией, позволяет повысить чувствительность и снизить предел детекции тест-систем в сравнении с сэндвич-ELISA на 1–2 порядка. Дополнительное использование флуоресцентного или люминесцентного субстрата способно повысить чувствительность системы анализа еще приблизительно в 10 раз.

В обзоре [21] приведен сравнительный анализ чувствительности различных тест-систем для количественного определения ботулинических токсинов, разработанных на основе МА, в зависимости от формата теста и используемого субстрата в сравнении с классическим “золотым” стандартом детекции ботулотоксинов – биологическим тестом с применением лабораторных мышей. Как следует из большого объема проанализированных авторами данных, применение флуоресцентных и люминесцентных субстратов и иммуно-ПЦР-реакции позволило не только вплотную приблизиться к пределу детекции биологического теста на мышах, но и в некоторых случаях значительно его превзойти. Мы полагаем, что использование флуоресцентных субстратов и перевод разработанных нами тест-систем в более современный формат позволят значительно снизить их предел детекции. Мы получили предварительные данные, подтверждающие наше предположение. Так,

использование стрептавидина, конъюгированного с фикоэритрином, в качестве детектирующего агента позволило на два порядка снизить предел детекции тест-системы на основе антител BNTA-9.1 и BNTA-4.1 (данные не опубликованы).

**Определение нейротоксинов типов А, В, Е, F в пищевых продуктах.** Мы показали возможность использования разработанных тест-систем для выявления ботулинических токсинов типов А, В, Е, F в пищевых консервированных продуктах, выбранных с учетом статистических данных об их заражении определенным типом токсина. С этой целью в навески консервированных продуктов, приготовленных в заводских условиях, вносили известные количества ботулинических токсинов. Их экстракцию с помощью PBST проводили через 30 мин. Полученные экстракты пищевых продуктов, содержащих нейротоксины, анализировали с применением разработанных сэндвич-ELISA. В качестве положительного контроля использовали те же препараты нейротоксинов в PBST. Данные этого эксперимента представлены в табл. 4. Процент выявления привнесенных токсинов определяли как соотношение значений оптического поглощения, соответствующих экстракту токсина из определенного образца пищи и токсину в PBST, находящихся в линейном диапазоне значений. Ни в одном из пищевых образцов токсина не выявлялись полностью, процент выявления варьировал от 40 до 78%, что может объясняться как более высоким фоновым значением, соответствующим пищевому образцу, так и не полной экстракцией привнесенных токсинов вследствие их неспецифической адсорбции компонентами пищи. Так, например, выявление внесенного BoNT/E в печеночном паштете составило 62%, а в рыбных консервах – 40% (табл. 4). Зависимость степени выявления ботулинических токсинов от вида тестируемого продукта, наблюдаемая нами, подтверждается и другими авторами [22].

Таким образом, мы получили специфические МА против ботулинических токсинов типов А, В, Е и F, вызывающих ботулизм человека. На их основе разработали тест-системы для детекции ботулинических нейротоксинов, способные специфично выявлять не только холотоксины в сложных биологических смесях, но и токсины в составе природных токсических комплексов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали среду Китт-Тароцци, тиогликолят, глюкозу, формальдегид, триптон, дрожжевой экстракт, пептон, РНК-азу, полный адьювант Фрейнда, неполный адьювант Фрейнда, пристан, раствор полиэтиленгликоля (HYBRU MAX), НАТ, *N*-оксисукцинимидный эфир биотина, диметилсульфоксид, *o*-фенилендиамин, конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (Sigma, США), ультрагель АсА 54, ультрагель АсА 34, сефарозу 4В, DEAE-сефадекс А-50, сефадекс G-50, SP-сефадекс G-50 (Pharmacia, Швеция), DMEM, эмбриональную телячью сыворотку (FCS) (Invitrogen, США), 96-луночные культуральные планшеты, ELISA-планшеты (Costar, США), конъюгат кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши с пероксидазой хрена (ДАКО, Дания), "Rapid ELISA mouse mAb isotyping kit" (Thermo Fisher Scientific, США), белок-А-сефарозу, люминесцентный субстрат ECL (Pierce, США), нитроцеллюлозную мембрану protran BA85, DEAE-целлюлозу (Whatman, США).

**Культивирование штаммов.** Для накопления нейротоксинов использовали: *S. botulinum* тип А штамм 501, *S. botulinum* тип В штамм 364, *S. botulinum* тип Е штамм 188/20, *S. botulinum* тип F штамм 470 Langeland. Бактерии культивировали на среде Китт-Тароцци в течение 24–48 ч при 35°C для типов А и В или при 28°C для типов Е и F. Далее бактерии, секретирующие нейротоксины типов А и В, культивировали на среде (рН 7.6), содержащей (процент по весу): триптон – 3, дрожжевой экстракт – 3, тиогликолят (0.1), глюкозу (0.5), при 35°C в течение 7 сут. *S. botulinum*, секретирующие нейротоксины типов Е и F, культивировали на среде (рН 7.2), содержащей (процент по весу): триптон – 1.5, пептон – 1.5, дрожжевой экстракт – 3, тиогликолят – 0.1, глюкозу – 0.5, при 28°C в течение 5 сут.

**Получение препаратов ботулинических нейротоксинов типов А, В, Е и F.** Культуру охлаждали и центрифугировали при 5000 g и 4°C в течение 30 мин. В случае ВоNT/A и ВоNT/B токсины из безмикробной культуральной жидкости концентрировали кислотным осаждением, добавляя постепенно 3 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до значения рН 3.8. Осадок отделяли центрифугированием при 15000 g и 4°C в течение 30 мин, затем растворяли в 0.2 М натрий-фосфатном буфере (рН 6.2). Далее токсины оса-

ждали добавлением насыщенного раствора сульфата аммония до 50% насыщения. В случае ВоNT/E и ВоNT/F токсин осаждали сульфатом аммония непосредственно из культуральной жидкости. Осадок, сформированный в течение 18–24 ч при 4°C, отделяли центрифугированием при 15000 g и 4°C в течение 30 мин, затем растворяли в 0.2 М натрий-фосфатном буфере (рН 6.2). К растворам токсинов добавляли РНК-азу до концентрации 100 мкг/мл и инкубировали 1 ч при 37°C.

Далее для получения очищенных препаратов ВоNT/A и ВоNT/B проводили последовательно следующие процедуры: гель-фильтрацию на ультрагеле АсА 54 в 0.067 М цитрат-фосфатном буфере при значении рН 5.6; ионообменную хроматографию на DEAE-целлюлозе в том же буфере; концентрирование добавлением насыщенного раствора сульфата аммония до 60% от насыщения; центрифугирование при 15 000 g и 4°C в течение 30 мин; растворение осадка в 0.1 М натрий-фосфатном буфере (рН 6.6); гель-фильтрацию на ультрагеле АсА 34 в 0.045 М борат-фосфатном буфере (рН 7.9); ионообменную хроматографию на DEAE-сефадексе А-50 в том же буфере, элюцию проводили в градиенте концентрации NaCl от 0 до 0.5 М; аффинную хроматографию на сефарозе 4В с иммобилизованными антителами против гемоглобулинов.

Для получения очищенного препарата ВоNT/E далее проводили последовательно следующие процедуры: гель-фильтрацию на ультрагеле АсА 54 в 0.05 М натрий-ацетатном буфере (рН 6.0); ионообменную хроматографию на DEAE-целлюлозе в том же буфере; гель-фильтрацию на ультрагеле АсА 34 в том же буфере; ионообменную хроматографию на DEAE-сефадексе А-50 в 0.05 М натрий-фосфатном буфере рН 8.0, элюцию токсина проводили в градиенте NaCl от 0 до 0.5 М.

Для получения очищенного препарата ВоNT/F проводили последовательно следующие процедуры: гель-фильтрацию на ультрагеле АсА 54 в 0.067 М цитрат-фосфатном буфере рН 5.6; ионообменную хроматографию на DEAE-целлюлозе в том же буфере; концентрирование добавлением насыщенного раствора сульфата аммония до 60% от насыщения; центрифугирование при 15000 g и 4°C в течение 30 мин; растворение осадка в 0.05 М Na-ацетатном буфере (рН 4.2); обессоливание на колонке с сефадексом G-50 в том же буфере; ионообменную хроматографию на SP-сефадексе G-50 в том же буфере с элюцией в градиенте концентрации NaCl от 0 до 0.5 М; концентрирование осаждением насыщенным раствором сульфата аммония до 60% от насыщения; центрифугирование при 15000 g и 4°C в течение 30 мин; растворение в 0.045 М борат-фосфатном буфере (рН 7.9); гель-фильтрацию на ультрагеле АсА 54 в том же буфере; ионообменную хроматографию на DEAE-сефа-

дексе А-50 в том же буфере, с элюцией в градиенте NaCl от 0 до 0.5 М.

Для определения концентрации токсинов использовали коэффициент экстинкции при 280 нм, равный  $1.63 \text{ мг}^{-1} \text{ см}^3$ .

**Получение препаратов ботулинических анатоксинов типов А, В, Е и F.** К растворам токсинов в фосфатном буфере (рН 6.7) добавляли формальдегид до 0.5%, инкубировали при 37°C в течение 7 сут.

**Получение гибридомных клеточных линий.** Мышей линии BALB/c иммунизировали внутрибрюшинно, в дозе 20 мкг анатоксина на одну мышшь. Первую иммунизацию проводили в полном адьюванте Фрейнда, последующие – в неполном адьюванте, интервал между инъекциями составлял 2 недели. Перед инъекцией растворы анатоксинов в PBS (3 мМ KCl, 1 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 140 мМ NaCl, 9 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) эмульгировали с равным объемом адьюванта. Последнюю (бустерную) инъекцию анатоксинов проводили в PBS, после чего через 3 сут у мыши стерильно извлекали селезенку, гомогенизировали и смешивали спленоциты с клетками мышиной миеломной линии SP2/0, которые предварительно культивировали в среде DMEM, содержащей 5% (по объему) эмбриональной телячьей сыворотки (FCS). Гибридизацию спленоцитов мыши и миеломы проводили с помощью 50% (по весу) раствора полиэтиленгликоля по методу Келлера и Мильштейна [16], после чего гибридационную смесь переносили в 96-луночные культуральные планшеты в среде DMEM, содержащей 20% (по объему) FCS, 0.1 мМ гипоксантина, 16 мкМ тимидина и 0.4 мкМ аминокпертина (НАТ). В планшеты за сутки до гибридизации помещали макрофаги из перитонеальной полости мышей для создания фидерного слоя. Рост гибридных клонов контролировали визуально под микроскопом, из лунок с выросшими клонами на 7–9-е сутки отбирали культуральную жидкость и тестировали методом непрямого ELISA. В случае регистрации положительного ответа клетки отбирали, наращивали и дважды клонировали методом лимитирующих разведений в среде DMEM, содержащей 20% FCS.

**Наработка и выделение моноклональных антител.** МА нарабатывали в асцитной жидкости мышей линии BALB/c, которым за 7–10 сут до введения гибридомных клеток была сделана инъекция пристана по 0.2 мл на мышшь. Все МА выделяли аффинной хроматографией на белок А-сефарозе, за исключением BNTF-4, которое выделяли ионообменной хроматографией на колонке MonoQ.

**Конъюгирование антител с биотином.** К раствору МА в концентрации 1 мг/мл в 0.1 М бикарбонатном буфере (рН 9.0) добавляли 1/8 объемную часть раствора *N*-оксисукцинимидного эфира биотина в DMSO с концентрацией 1 мг/мл и инкубировали 4 ч в темноте при комнатной темпе-

ратуре. Для остановки реакции добавляли 1 М раствор  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 мкл на 1 мг антител) и диализовали против PBS.

**Твердофазный иммуноферментный анализ. Непрямой метод.** Нативный токсин вносили в лунки планшетов (по 50 нг на лунку) в 0.05 М карбонатном буфере (рН 9.6) и сорбировали в течение ночи при +4°C. Свободные центры связывания пластика блокировали 1% раствором желатина в PBS в течение 30 мин. Затем в лунки планшета вносили исследуемые образцы, содержащие антитела, и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После инкубации планшеты отмывали раствором PBST, добавляли конъюгат кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши с пероксидазой хрена и инкубировали 40 мин. В качестве субстрата использовали 4 мМ раствор *o*-фенилендиамина в цитрат-фосфатном буфере (26 мМ лимонная кислота, 50 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , рН 5.0), содержащем 0.003% (по объему)  $\text{H}_2\text{O}_2$ . После развития окраски реакцию останавливали добавлением равного объема 10% серной кислоты. Оптическое поглощение определяли при длине волны 490 нм с помощью мультипланшетного спектрофотометра Anthos 2020.

**Сандвич-ELISA.** В лунки планшетов вносили МА (антитела “захвата”) в концентрации 10 мкг/мл в 0.05 М карбонатном буфере (рН 9.6) по 100 мкл на лунку и иммобилизовали в течение ночи при +4°C. Свободные центры связывания пластика блокировали 1% раствором желатина в PBS в течение 30 мин, вносили соответствующий токсин и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл антител, меченных биотином (антитела детекции), в концентрации 10 мкг/мл, инкубировали 1 ч при комнатной температуре и добавляли конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена по инструкции производителя и инкубировали 40 мин при комнатной температуре. После каждой стадии планшеты отмывали PBST. Реакцию визуализировали так же, как и в ELISA.

**Определение константы аффинности антител.** Константу аффинности антител определяли непрямым ELISA [17]. Для этого в лунки планшетов сорбировали различные количества соответствующих токсинов, блокировали свободные центры связывания пластика и вносили раствор антител в последовательных двукратных разведениях от 10 до 0.001 мкг/мл. После этого добавляли конъюгат кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши с пероксидазой хрена, иммунохимическую реакцию визуализировали так же, как и в предыдущих методах. Константы аффинности вычисляли по формуле  $K_a = (n - 1) / (2(n[\text{Ab}'] - [\text{Ab}]))$ , где  $[\text{Ab}']$  – концентрация антител, соответствующая 50% связыванию при сорбции токсина 20 нг на лунку, а  $[\text{Ab}]$  – концентрация антител, соответ-



ствующая 50% связыванию при сорбции токсина 50 нг на лунку. Отношение концентраций антигена выражается буквой  $n$ , в данном случае  $n = 2.5$ .

**Определение типов тяжелых и легких цепей МА.** Определение типов тяжелых и легких цепей полученных антител проводили непрямым ELISA с помощью коммерческого набора "Rapid ELISA mouse mAb isotyping kit", согласно рекомендациям производителя.

**Определение ботулинических токсинов в пищевых продуктах.** В навески (по 500 мг) пищевых продуктов из свежевскрытых консервов вносили по 2 мкг соответствующих токсинов и тщательно перемешивали в течение 15 мин. Экстракцию проводили раствором PBST, перемешивая в течение 15 мин. Смесь центрифугировали при 12 000  $g$  в течение 10 мин, отбирали надосадочную жидкость, которую использовали в сандвич-ELISA для определения содержания токсина. В качестве положительного контроля использовали соответствующий токсин в PBST, а в качестве отрицательного контроля – экстракты пищевых продуктов, в которые токсины не вносили.

**Электрофорез и Вестерн-блоттинг.** Электрофоретический анализ препаратов нейротоксинов и МА проводили в градиентном 9–20% полиакриламидном геле в присутствии 2-меркаптоэтанола и SDS по методу Лэммли [23] в электрофоретической камере типа Bio-Rad Mini Protean Tetra System (Bio-Rad, США). Для получения электрофореграммы гели окрашивали раствором 0.04% Кумаси G-250 в 3.4% хлорной кислоте. Для получения иммуноэлектрофореграммы содержимое геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану protran BA85 и разрезали ее на фрагменты, соответствующие белковым трекам. Фрагменты мембраны окрашивали либо амидо-черным, либо блокировали 1% (по весу) раствором обезжиренного сухого молока в PBST в течение 30 мин и инкубировали с соответствующими МА к нейротоксинам, а затем с конъюгированными с пероксидазой хрена кроличьими антителами к иммуноглобулинам мыши. Нитроцеллюлозную мембрану на каждой стадии тщательно отмывали PBST. Сигналы визуализировали на фотопленке с помощью люминесцентного субстрата ECL.

**Метод определения токсичности ботулинических токсических комплексов на мышах.** Токсическую активность среды культивирования соответствующих штаммов-продуцентов *C. botulinum* определяли в MLD с использованием белых беспородных мышей; для этого готовили последовательные двукратные разведения культуральной жидкости в PBS, содержащим 0.1% желатина. Приготовленные растворы вводили мышам по 0.5 мл внутрибрюшинно. Максимальное разведение, вызывавшее гибель всех мышей в группе на третьи сутки, определялось как 1 MLD. Биологическую актив-

ность препарата, равную величине разведения, умноженной на 2, выражали в MLD/мл.

**Определение нейтрализующей активности МА против BoNT/A.** Токсическую активность определяли по общепринятому методу на белых мышах. Препараты МА в количестве 10 мкг смешивали с различными дозами токсического ботулинического комплекса типа А, инкубировали 30 мин при комнатной температуре и вводили по 0.5 мл животным. В качестве положительного контроля использовали стандартизованную противоботулиническую сыворотку типа А, учет гибели животных проводили на четвертый день.

Работа выполнена при поддержке государственного проекта Минпромнауки (шифр "Биопатоген").

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Marvaud J.C., Raffestin S., Popoff M.R.* // C. R. Biol. 2002. V. 325. P. 863–883.
2. *Arnon S.S., Schechter R., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Fine A.D., Hauer J., Layton M., Lillibridge S., Osterholm M.T., O'Toole T., Parker G., Perl T.M., Russell P.K., Swerdlow D.L., Tonat K.* // Jama. 2001. V. 285. P. 1059–1070.
3. *Bossi P., Bricaire F.* // Presse Med. 2003. V. 32. P. 463–465.
4. *Oguma K., Fujinaga Y., Inoue K.* // Microbiol. Immunol. 1995. V. 39. P. 161–168.
5. *Simpson L.L.* // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2004. V. 44. P. 167–193.
6. *Dong M., Yeh F., Tepp W.H., Dean C., Johnson E.A., Janz R., Chapman E.R.* // Science. 2006. V. 312. P. 592–596.
7. *Fischer A., Montal M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 10447–10452.
8. *Deshpande S.S., Sheridan R.E., Adler M.* // Toxicol. 1995. V. 33. P. 551–557.
9. *Schiavo G., Benfenati F., Poulain B., Rossetto O., Polverino de Laureto P., DasGupta B.R., Montecucco C.* // Nature. 1992. V. 359. P. 832–835.
10. *Schiavo G., Rossetto O., Catsicas S., Polverino de Laureto P., DasGupta B.R., Benfenati F., Montecucco C.* // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 23784–23787.
11. *Chen F., Kuziemko G.M., Amersdorfer P., Wong C., Marks J.D., Stevens R.C.* // Infect. Immun. 1997. V. 65. P. 1626–1630.
12. *Вертуев Ю.В.* // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 1999. № 5. С. 40–47.
13. *Liu W., Montana V., Chapman E., Mohideen U., Parapura V.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 13621–13625.
14. *Ma H., Zhou B., Kim Y., Janda K.D.* // Toxicol. 2006. V. 47. P. 901–908.
15. *Warner M.G., Grate J.W., Tyler A., Ozanich R.M., Miller K.D., Lou J., Marks J.D., Bruckner-Lea C.J.* // Biosens. Bioelectron. 2009. P. 179–184.
16. *Köhler G., Milstein C.* // Nature. 1975. V. 256. P. 495–497.

17. Beatty J.D., Beatty B.G., Vlahos W.G. // J. Immunol. Methods. 1987. V. 100. P. 173–179.
18. Adekar S., Takahash T., Jones R., Al-Saleem F., Ancharski D., Root M., Kapadnis B., Simpson L., Dessain S. // PloS ONE. 2008. August.
19. Nowakowski A., Wang C., Powers D.B., Amersdorfe P., Smith T.J., Montgomery V.A., Sheridan R., Blake R., Smith L.A., Marks J.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 11346–11350.
20. Lindström M., Korkeala H. // Clin. Microbiol. Rev. 2006. V. 19. P. 298–314.
21. Čapek P., Dickerson T. // Toxins. 2010. V. 2. P. 24–53.
22. Sharma K.S., Ferreira J., Eble B., Whitin R. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 1231–1238.
23. Laemmly U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

## Monoclonal Antibodies to Type A, B, E and F Botulinum Neurotoxins

S. G. Abbasova\*, N. V. Rudenko\*\*, A. Yu. Gorokhovatsky\*, M. V. Kapralova\*\*, I. D. Vinogradova\*\*\*, Yu. V. Vertiev\*\*\*, V. A. Nesmeyanov\*\*\*\*†, and E. V. Grishin\*\*\*\*

#Phone: +7 (4967) 730-653; e-mail: rudenko@fibkh.serpukhov.su

\*Branch of Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Science Avenue 6, Pushchino, 142290, Russia

\*\*Pushchino State University

\*\*\*Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

\*\*\*\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Mouse monoclonal antibodies against the most acutely toxic substances, botulinum neurotoxins (BoNTs) of types A, B, E, and F, was generated and characterized, that recognize their respective toxins in natural toxin complex. Based on these antibodies, we developed sandwich-ELISA for quantitative detection of these toxins. For each respective toxin the detection limit of the assay was: BoNT/A – 0.4 ng/ml, BoNT/B – 0.5 ng/ml; BoNT/E – 0.1 ng/ml; and for BoNT/F – 2.4 ng/ml. The developed assays permitted quantitative identification of the BoNTs in canned meat and vegetables. The BNTA-4.1 and BNTA-9.1 antibodies possessed neutralizing activity against natural complex of the botulinum toxin type A *in vivo*, both individually and in mixture, the mixture of the antibodies neutralized the higher dose of the toxin. The BNTA-4.1 antibody binds specifically the light chain (the chain with protease activity) of the toxin, whereas BNTA-9.1 interacts with the heavy chain. We believe that the BNTA-4.1 and BNTA-9.1 monoclonal antibodies are prospective candidates for development of humanized therapeutic antibodies for treatment of BoNT/A-caused botulism.

*Keywords: botulism, type A, B, E and F botulinum neurotoxins, monoclonal antibodies, sandwich-ELISA, toxin neutralization.*