

## ИММУНОЛОГИЯ

УДК 57.083.3

## ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ГЛИКОПРОТЕИНА ВИРУСА ЭБОЛЫ

О.Б. Шемчукова<sup>1</sup>, И.Г. Дементьева<sup>1</sup>, Н.Е. Варламов<sup>1</sup>, Л.П. Позднякова<sup>1</sup>, М.Н. Боков<sup>1</sup>,  
Т.К. Алиев<sup>2,\*</sup>, А.А. Панина<sup>3</sup>, Д.А. Долгих<sup>4</sup>, М.П. Кирпичников<sup>4</sup>, П.Г. Свешников<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения;  
Россия, 117638, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8;*

<sup>2</sup> *кафедра химической энзимологии, химический факультет, Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова;*

*Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3;*

<sup>3</sup> *Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;  
Россия, 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;*

<sup>4</sup> *кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12*

\* e-mail: ta12345@list.ru

Проведена иммунизация мышей BALB/c рекомбинантным гликопротеином вируса Эбола. В результате селекции и клонирования мышинных гибридом получено пять генетически стабильных клонов моноклональных антител GPE118 (IgG), GPE274 (IgM), GPE325 (IgM), GPE463 (IgM) и GPE534 (IgG). Проведены выделение и очистка указанных антител из асцитной жидкости мышей линии BALB/c с использованием аффинной хроматографии на сорбенте белок G-сефарозе (для IgG) и методом преципитации эуглобулинов (для IgM). Проведен иммунохимический анализ эпитопной специфичности выделенных антител с целью отбора не менее трех из них в качестве компонентов комбинированного терапевтического средства для профилактики и лечения геморрагической лихорадки. Из данных иммуноблоттинга и сэндвич-ИФА следует, что эпитоп, узнаваемый GPE 534, отличается от эпитопов, узнаваемых моноклональными антителами GPE 118 и GPE 325. Последние два антитела также различаются по эпитопной специфичности, о чем свидетельствуют данные иммуноблоттинга и характер взаимодействия указанных антител с интактным и окисленным (частично дегликозилированным) рекомбинантным гликопротеином. Для исследования биологической активности и разработки на их основе рекомбинантных продуктов выбраны три кандидатных высокоаффинных моноклональных антитела — GPE 534, GPE 118 и GPE 325.

**Ключевые слова:** вирус Эбола, гликопротеин вируса Эбола, гибридома, моноклональные антитела, мыши линии BALB/c, непрямой ИФА, сэндвич-ИФА, иммуноблоттинг.

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 [1]. 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 рекомбинантный человеческий активированный белок С [2], повышает выживаемость на 18%. Другим подходом является использование синтетических антисмысловых аналогов олигонуклеотидов, образующих дуплексы со специфическими РНК вирусов [3]. Внутривенное вве-

дение малых интерферирующих РНК привело к повышению выживаемости в интервале от 66 до 100% в зависимости от количества инъекций [4]. Однако необходимо подчеркнуть, что все вышеописанные методы будут эффективны, только если лечение начнется в течение первых 30–60 мин от момента заражения.

Разработка средств антителотерапии в отношении вируса Эбола проводится с 1990-х гг. Из восьми белков вируса ключевой мишенью для средств иммунотерапии является вирусный гликопротеин (GP), являющийся решающим фактором патогенности. Этот 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 [5]. GP является центральным

компонентом вакцин, а также мишенью для нейтрализующих антител и ингибиторов присоединения и слияния [6].

Использование отдельных моноклональных антител (МоАт) или антител, полученных из крови выживших больных, давало неустойчивые результаты [7–9]. Вместе с тем, в опытах на приматах было показано, что в отличие от использования различных неспецифических средств антивирусной терапии пассивная иммунизация антителами позволяет добиться терапевтического эффекта при введении через 24 ч после инфицирования [10, 11]. В процессе получения и исследования на модельных животных различных МоАт против GP росло понимание того, что только комбинация антител, специфичных к различным эпитопам, может обеспечить защитный эффект и снизить летальность. Значительный прорыв был достигнут в результате создания “антительного коктейля” ZMapp [12]. В экспериментах на морских свинках и макаках-резус были испытаны различные комбинации трех химерных антител, специфичных к GP. Макаки разделили на три группы по шесть животных, которым вводили три дозы препарата в количестве 50 мг/кг на 3-й, 4-й и 5-е сут после инфицирования летальными дозами вируса, соответственно. Сформированный в результате предварительных испытаний препарат ZMapp обеспечил 100%-ую выживаемость у всех 18 обезьян.

Целью настоящей работы стало получение новых оригинальных МоАт против рекомбинантного GP, их иммунохимическая характеристика и отбор на основе данных аффинности и кросс-специфичности кандидатных МоАт, прототипов рекомбинантных антител для комбинированной терапии заболеваний, вызванных EBOV.

### Материалы и методы

Для получения МоАт использовали очищенный рекомбинантный гликопротеин вирусной оболочки (GP EBOV rGPdTM, IBT Bioservices, США, Кат. № 0501-016, лот № 1409002) штамма Заир без трансмембранного домена, экспрессированный в бакуловирусе. Для иммунизации мышей линии BALB/c использовали конъюгат EBOV rGPdTM и белка теплового шока HSP65 из *M. tuberculosis*, который получали, как описано в работе [13]. Одной партии мышей вводили конъюгат в подушечки задних лапок, другой — внутрибрюшинно. В обоих случаях иммунизация проводилась двукратно с интервалом в 14 сут с использованием полного (первичная иммунизация) и неполного (вторичная иммунизация) адъюванта Фройнда. Для гибридизации были использованы лимфоциты подколенных лимфоузлов и спленоциты мыши. Полученные лимфоциты гибридизировали с клетками миеломы SP2/0 по стандартной методике с использованием 50% ПЭГ 4000 [14]. Тестирование супернатантов гибридом проводили методом непрямого иммуноферментного

анализа (ИФА) с использованием биотинилированного EBOV rGPdTM. Биотинилирование гликопротеина проводили при помощи активированного эфира биотина в соотношении биотин к GP в реакционной смеси равном 15:1. МоАт 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. Субизотипы антител определяли методом ИФА с использованием коммерческих антисывороток в соответствии с рекомендациями производителя (набор для изотипирования Mouse Typer Isotyping Panel #1722055, Bio-Rad, США). МоАт, принадлежащие к изотипу IgG, выделяли методом аффинной хроматографии на белок G-сефарозе (GE Healthcare, США) и переводили диализом в фосфатно-солевой буфер. МоАт, принадлежащие к изотипу IgM, выделяли методом осаждения эуглобулинов путем диализа асцитной жидкости против трех смен дистиллированной воды на холоду. Полученный преципитат отделяли центрифугированием и растворяли в фосфатно-солевом буфере [15]. Степень чистоты МоАт контролировали при помощи электрофореза в 10%-ом полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) и  $\beta$ -меркаптоэтанола в ступенчатой буферной системе Лэммли (SDS-PAGE), а также при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе “AKTA explorer/purifier/basic” (GE Healthcare, США) в режиме гель-фильтрации с использованием колонки Superdex 200 (1 × 40 см).

Деструкцию гликанов EBOV rGPdTM проводили путем окисления белка в растворе, содержащем 5,33 мМ NaIO<sub>4</sub> [16]. Сравнительный непрямой ИФА исходного (интактного) и окисленного гликопротеина проводили, сорбируя 1 мкг/мл антигена EBOV rGPdTM на поверхности планшета. Антитела вносили в разведении от 10 мкг/мл до 10 нг/мл. В качестве вторичных антител использовали антимышиний козий иммуноглобулин, конъюгированный с пероксидазой хрена, в рабочем разведении 1:50000.

Для подтверждения специфичности новой панели МоАт использовали метод иммуноблоттинга. На первом этапе проводили электрофоретическое разделение антигена GP вируса Эбола в 12%-ом полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Перенесенные белки выявляли с антивидовым пероксидазным конъюгатом антител против IgG мыши в течение 1 ч при 37°C.

Сэндвич-ИФА проводили с использованием полученного по методу Накане [17] конъюгата МоАт GPE534 с пероксидазой хрена.

Все значения оптической плотности по данным ИФА усреднены по результатам трех измерений.

### Результаты и обсуждение

Для получения МоАт, специфичных к гликопротеину EBOV, было решено использовать рекомбинантный EBOV rGPdTM, конъюгированный с белком теплового шока HSP65 из *M. tuberculosis*. Конъюгирование рекомбинантных антигенов с микобактериальными белками теплового шока существенно повышает их иммуногенность и позволяет получать высокоаффинные МоАт против эпитопов природных белков [13]. В результате иммунизации, гибридизации с клетками миеломы SP2/0 и последующих процедур скрининга и селекции было отобрано пять групп клонов — потомков одной первичной культуры, состоящих в совокупности из 35 субклонов. Для каждого из субклонов были получены асцитные жидкости, из которых были выделены МоАт. По результатам непрямого ИФА с использованием биотинилированного EBOV rGPdTM были отобраны пять антител для дальнейшего иммунохимического анализа, из которых два МоАт принадлежали к IgG-, а три МоАт к IgM-подклассу. Результаты титрования отобранных антител представлены в табл. 1.

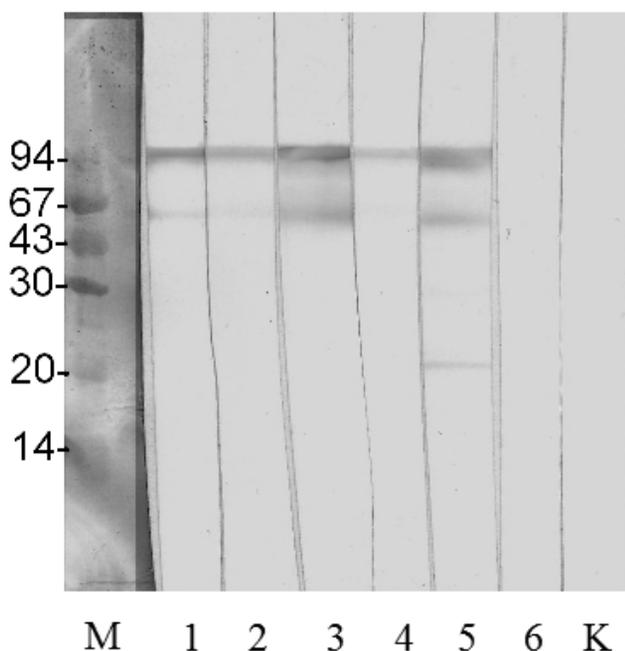
Набор антител ZMapp, показавший наибольшую активность в доклинических исследованиях, состоит из МоАт 13С6 и 4G7, направленных против N-концевого и муцин-подобного доменов во

фрагменте гликопротеина GP1 и МоАт 2G4 против фрагмента GP2 [18]. Оба фрагмента являются компонентами зрелого белка GP и образуются в результате расщепления белка-предшественника под действием фурина. Для проведения обоснованного отбора трех или более кандидатных МоАт анти-Эбола в первую очередь требовалось доказать, что МоАт взаимодействуют с тремя неперекрывающимися эпитопами GP. Для решения данной задачи было решено провести сравнительный анализ полученных МоАт методами иммуноблоттинга, непрямого ИФА с иммобилизованными окисленным и интактным EBOV rGPdTM, а также с помощью сэндвич-ИФА.

Рекомбинантный GP представляет собой белок с теоретической молекулярной массой ~68 кДа, без учета массы гликозидных остатков. Вследствие высокой степени гликозилирования интактный белок при электрофорезе в полиакриламидном геле мигрирует в области ~94 кДа. При условии полного восстановления дисульфидных связей GP мигрирует в полиакриламидном геле в виде двух размытых полос ~67 кДа и ~20 кДа. По данным результата иммуноблоттинга (рисунок) все МоАт интенсивно окрашивают полосу, соответствующую полноразмерной молекуле GP.

Кроме того, МоАт GPE 118, GPE 325 и GPE 534 взаимодействуют с белком с молекулярной массой ~67 кДа, а МоАт GPE 534 дополнительно выявляет полосу с молекулярной массой ~20 кДа. Эти результаты являются убедительным доказательством специфичности новой панели МоАт к GP, а также свидетельствуют о том, что по крайней мере МоАт GPE 534 отличается по эпитопной специфичности от МоАт GPE 118 и GPE 325.

Гликопротеин EBOV содержит множество сайтов гликозилирования для присоединения N- и O-гликанов, которые составляют приблизительно 1/3 молекулярной массы зрелого GP. В этой связи представляло интерес выяснить, как влияет целостность углеводных остатков GP на связывание исследуемых МоАт с модифицированным и интактным гликопротеином. С этой целью мы провели деструкцию гликанов путем окисления NaIO<sub>4</sub>, которое приводит к удалению приблизительно 50% углеводов, включая всю фукозу, сиаловую кислоту и 2-ацетамидо-2-дезоксигалактозу [16]. Окисленный и интактный EBOV rGPdTM использовали в качестве антигена захвата в непрямом ИФА с исследуемыми МоАт. Из представленных в табл. 2 данных следует, что окисление углеводных остатков rGPdTM по-разному влияет на связывание МоАт. В большинстве случаев происходит усиление связывания (GPE 118, GPE 274, GPE 463), а для МоАт GPE 325 и GPE 534 характер связывания не изменяется. Этот результат свидетельствует о том, что анализируемые МоАт, скорее всего, направлены против разных детерминант GP.



**Рисунок.** Иммуноблот антигена rGPdTM вируса Эбола в восстанавливающих условиях после SDS-PAGE с моноклональными антителами GPE118 (дорожка 1), GPE274 (дорожка 2), GPE325 (дорожка 3), GPE463 (дорожка 4), GPE534 (дорожка 5), Ru52 — МоАт против вируса краснухи — отрицательный контроль (дорожка 6), контроль антивидового пероксидазного конъюгата (дорожка К). М — стандарты молекулярной массы, кДа

Таблица 1

Результаты титрования биотинилированного EBOV rGPdTM в непрямом ИФА (приведены значения OD<sub>450</sub>) с иммобилизованными антителами

rGPdTM — биотин, нг/мл	GPE118	GPE274	GPE325	GPE463	GPE534
1000	2,937	2,617	2,919	2,754	2,959
300	2,591	1,235	1,309	1,364	2,824
100	1,158	0,500	0,458	0,556	1,315
30	0,428	0,180	0,206	0,211	0,519
10	0,170	0,083	0,063	0,088	0,205
3	0,077	0,044	0,042	0,042	0,090
1	0,035	0,019	0,023	0,020	0,031
0,3	0,023	0,019	0,021	0,016	0,020

Таблица 2

Результаты титрования MoAt в непрямом ИФА (приведены значения OD<sub>450</sub>) с иммобилизованными окисленным и интактным EBOV rGPdTM

Концентрация MoAt, нг/мл	Сорбированный антиген									
	Окисленный GP (+NaIO <sub>4</sub> )					Интактный GP				
	GPE 118	GPE 274	GPE 325	GPE 463	GPE 534	GPE 118	GPE 274	GPE 325	GPE 463	GPE 534
10000	1,053	1,028	1,994	0,971	1,454	0,562	0,499	1,872	0,491	1,462
3000	0,776	0,681	1,723	0,645	1,204	0,498	0,394	1,851	0,403	1,276
1000	0,607	0,491	1,529	0,484	1,019	0,377	0,324	1,811	0,326	1,202
300	0,499	0,346	0,858	0,353	0,743	0,279	0,256	1,238	0,269	1,067
100	0,366	0,214	0,447	0,202	0,532	0,178	0,208	0,657	0,248	0,898
30	0,180	0,080	0,154	0,095	0,284	0,114	0,137	0,326	0,144	0,561
10	0,053	0,029	0,053	0,026	0,110	0,051	0,073	0,171	0,080	0,258

Окончательный вывод об эпитопной специфичности был сделан на основании данных сэндвич-ИФА. При проведении твердофазного сэндвич-ИФА для детекции мономерных антигенов антитело захвата иммобилизуют на твердую фазу, затем добавляют антиген и после формирования иммунного комплекса на твердой фазе вносят второе антитело, меченное ферментом. Если каждое MoAt в паре направлено против разных (неперекрывающихся) эпитопов, то происходит образование тройного комплекса: антитело захвата — антиген — конъюгат.

Сэндвич-ИФА проводили в двух режимах: в присутствии (+Ag) и в отсутствие (–Ag) антигена EBOV rGPdTM. Титрование конъюгата в отсутствие антигена позволяло оценить вклад неспецифического связывания. По результатам титрования пероксидазного конъюгата MoAt GPE534 в сэндвич-ИФА (табл. 3) наблюдается, что при разведении конъюгата 27000 и 81000 значения оптической плотности OD<sub>450</sub> (выделены полужирным

шрифтом) в присутствии антигена превышают значения контроля (–Ag). Это может свидетельствовать о том, что MoAt 534 образует тройной комплекс как с MoAt GPE 118, так и с MoAt GPE 325.

В результате проведения иммунохимического анализа двух антител IgG- и трех антител IgM-изотипа против гликопротеина вируса Эбола было идентифицировано три кандидатных MoAt, взаимодействующих с различными эпитопами антигена. Так, из данных иммуноблота и сэндвич-ИФА следует, что эпитоп, узнаваемый MoAt GPE 534, отличается от эпитопов MoAt GPE 118 и GPE 325. Последние два антитела также различаются по эпитопной специфичности, о чем свидетельствуют данные иммуноблоттинга и характер взаимодействия указанных антител с интактным и окисленным EBOV rGPdTM.

MoAt GPE 534, GPE 118 и GPE 325 представляют собой высокоаффинные антитела (табл. 1),

Таблица 3

Результаты титрования конъюгата МоАт GPE534 с пероксидазой (приведены значения OD<sub>450</sub>) в сэндвич-ИФА с использованием каждого из антител в качестве сорбента и антигена EBOV rGPdTM в концентрации 50 нг/мл (+Ag) и 0 нг/мл (–Ag)

Разведение конъюгата GPE534-HRP	GPE118		GPE274		GPE325		GPE463		GPE534	
	+Ag	–Ag	+Ag	–Ag	+Ag	–Ag	+Ag	–Ag	+Ag	–Ag
3000	3,267	3,141	2,429	2,208	3,168	2,922	2,399	2,322	2,674	2,765
9000	3,222	3,133	1,774	1,556	3,160	2,029	1,814	1,632	1,743	1,740
27000	<b>3,197</b>	<b>1,756</b>	0,930	0,772	<b>2,291</b>	<b>1,076</b>	0,986	0,855	0,803	0,866
81000	<b>2,430</b>	<b>0,969</b>	0,402	0,330	<b>1,088</b>	<b>0,453</b>	0,432	0,356	0,323	0,325

специфичные к разным детерминантам GP. Данная совокупность свойств является весомой предпосылкой для проведения тестирования указанных антител или их рекомбинантных производных на животных, инфицированных вирусом Эбола.

Работа выполнена с использованием средств субсидии (Соглашение № 14.607.21.0096), выделя-

емой Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0096).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baize S., Pannetier D., Oestereich L. et al. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea // N. Engl. J. Med. 2014. Vol. 371. N 15. P. 1418–1425.

2. 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. N 11. P. 1618–1629.

3. 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. N 9400. P. 1953–1958.

4. 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. N 9. P. 991–994.

5. Volchkov V.E., Feldmann H., Volchkova V.A., Klenk H.D. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. N 10. P. 5762–5767.

6. Lee J.E., Saphire E.O. Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry // Future Virol. 2009. Vol. 4. N 6. P. 621–635.

7. Jahrling P.B., Geisbert J.B., Swearingen J.R., Larsen T., Geisbert T.W. Ebola hemorrhagic fever: evaluation of passive immunotherapy in nonhuman primates // J. Infect. Dis. 2007. Vol. 196. Suppl. 2. P. S400–S403.

8. Parren P.W., Geisbert T.W., Maruyama T., Jahrling P.B., Burton D.R. Pre- and postexposure prophylaxis of Ebola virus infection in an animal model by passive transfer of a neutralizing human antibody // J. Virol. 2002. Vol. 76. N 12. P. 6408–6412.

9. Oswald W.B., Geisbert T.W., Davis K.J., Geisbert J.B., Sullivan N.J., Jahrling P.B., Parren P.W., Burton D.R. Neu-

tralizing antibody fails to impact the course of Ebola virus infection in monkeys // PLoS Pathog. 2007. Vol. 3. N 1. e9.

10. 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. N 44. P. 18030–18035.

11. 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. N 138. P. 138–181.

12. Qiu X., Wong G., Audet J. et al. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with Zmapp // Nature. 2014. Vol. 514. N 7520. P. 47–53.

13. Sveshnikov P., Kiselev V. 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.

14. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature. 1975. Vol. 256. N 5517. P. 495–497.

15. Garcia-González M., Betteger S., Ott S., Olivier P., Kadouche J., Pouletty P. Purification of murine IgG3 and IgM monoclonal antibodies by euglobulin precipitation // J. Immunol. Methods. 1988. Vol. 111. N 1. P. 17–23.

16. Westwood J., Thomas P. Studies on the structure and immunological activity of carcinoembryonic antigen — the role of disulphide bonds // Br. J. Cancer. 1975. Vol. 32. N 6. P. 708.

17. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation // J. Histochem. Cytochem. 1974. Vol. 22. N 12. P. 1084–1091.

18. Ponomarenko J., Vaughan K., Sette A., Maurer-Stroh S. Conservancy of mAb epitopes in Ebolavirus glycoproteins of previous and 2014 outbreaks // PloS Curr. 2014. Vol. 6.

Поступила в редакцию 02.09.2015

## DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO EBOLA VIRUS GLYCOPROTEIN

*O.B. Schemchukova*<sup>1</sup>, *I.G. Dement'yeva*<sup>1</sup>, *N.E. Varlamov*<sup>1</sup>, *L.P. Pozdnyakova*<sup>1</sup>, *M.N. Bokov*<sup>1</sup>,  
*T.K. Aliev*<sup>2,\*</sup>, *A.A. Panina*<sup>3</sup>, *D.A. Dolgikh*<sup>4</sup>, *M.P. Kirpichnikov*<sup>4</sup>, *P.G. Sveshnikov*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy,  
Simferopol Bulvar 8, Moscow, 117638, Russia;*

<sup>2</sup> *Department of Chemical Enzymology, School of Chemistry,*

*M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–3, Moscow, 119234, Russia;*

<sup>3</sup> *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, GSP-7, Moscow, 117997, Russia;*

<sup>4</sup> *Department of Bioengineering, School of Biology,*

*M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia;*

\* *e-mail: ta12345@list.ru*

BALB/c mice were immunized with recombinant Ebola virus glycoprotein. Following selection, screening and cloning of murine hybridomas we obtained 5 genetically stable clones of monoclonal antibodies GPE118 (IgG), GPE274 (IgM), GPE325 (IgM), GPE463 (IgM), and GPE534 (IgG). These antibodies were isolated and purified from ascitic fluid of BALB/c mice using Protein G affinity chromatography (IgG) and euglobulin precipitation method (IgM). For the selection of at least 3 candidate antibodies to be tested in biological assays as components of an antibody cocktail for the prophylaxis and treatment of hemorrhagic fever, we carried out an immunochemical analysis of epitope specificity of isolated antibodies. Based on immunoblotting and sandwich ELISA data, it became evident that the epitope recognized by GPE 534 is different from GPE 118 and GPE 325 epitopes. The latter two antibodies also have different epitope specificity. It is evidenced from immunoblotting data as well as from binding data of these antibodies with intact and oxidized (partly deglycosylated) recombinant glycoprotein. For the studies of biological activity and the development of recombinant counterparts, we isolated 3 candidate high-affinity monoclonal antibodies GPE 534, GPE 118, and GPE 325.

**Key words:** *Ebola virus, Ebola virus glycoprotein, hybridoma, monoclonal antibodies, BALB/c mice, indirect ELISA, sandwich ELISA, immunoblot.*

### Сведения об авторах

*Шемчукова Ольга Борисовна* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения. Тел.: 8-499-613-23-65; e-mail: rcmdt404@yandex.ru

*Дементьева Ирина Григорьевна* — ст. науч. сотр. Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения. Тел.: 8-499-613-23-65; e-mail: irina.dementieva@mail.ru

*Варламов Николай Евгеньевич* — вет. врач Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения. Тел.: 8-499-613-23-65; e-mail: rcmdt404@ya.ru

*Позднякова Любовь Петровна* — науч. сотр. Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения. Тел.: 8-499-613-23-65; e-mail: plp1810@inbox.ru

*Боков Максим Николаевич* — науч. сотр. Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения. Тел.: 8-499-613-23-65; e-mail: schpundic@gmail.ru

*Алиев Теймур Кантамирович* — науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ. Тел.: 8-495-330-66-38; e-mail: ta12345@list.ru

*Панина Анна Алексеевна* — науч. сотр. Института биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел.: 8-495-330-66-38; e-mail: panina@ibch.ru

*Долгих Дмитрий Александрович* — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-336-80-11; e-mail: dolgikh@nmr.ru

*Кирпичников Михаил Петрович* — академик РАН, проф., докт. биол. наук, декан, зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru

*Свешников Петр Георгиевич* — докт. биол. наук, проф., генеральный директор Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения. Тел.: 8-499-613-23-65; e-mail: petersveshnikov@list.ru