

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-48

**МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА,  
НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ ТОКСИН В *CLOSTRIDIODES DIFFICILE*****MONOCLONAL SINGLE-DOMAIN ANTIBODIES NEUTRALIZE TOXIN B  
OF *CLOSTRIDIODES DIFFICILE***

И. А. Алексеева, А. С. Унгур, И. А. Фаворская, А. И. Тухватулин, Д. В. Щебляков

*Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва*

I. A. Alekseeva, A. S. Ungur, I. A. Favorskaya, A. I. Tukhvutulin, D. V. Shcheblyakov

*N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow*

✉alekseeva.irina.21.10.1997@gmail.com

**Аннотация**

*Clostridioides difficile* — ведущая причина антибиотик-ассоциированной диареи. Стандартная терапия включает применение антибиотиков, эффективность которых снижается в связи с появлением резистентных штаммов. В качестве альтернативной терапии интерес представляют препараты, направленные на нейтрализацию основных факторов патогенности бактерии — токсинов А и В. В данной работе были получены однодоменные антитела, нейтрализующие действие токсина В.

**Abstract**

*Clostridioides difficile* is a leading cause of antibiotic-associated diarrhea. Standard treatment includes the use of antibiotics, but its efficacy has decreased due to the emergence of resistant strains of bacteria. An alternative therapeutic strategy may involve agents that target the key pathogenicity factors of *C. difficile*, toxin A and toxin B. Here, we have isolated monoclonal single-domain antibodies with potent neutralizing activity against toxin B.

Инфекция, ассоциированная с *Clostridioides difficile* (CDI), — инфекционное заболевание, возбудителем которого служат токсин-продуцирующие штаммы бактерии *Clostridioides difficile*. Основными симптомами CDI являются диарея со слизью и кровью, повышенная температура тела, слабость, тошнота, рвота, боли в животе. Тяжелые осложнения инфекции включают перфорации толстого кишечника и токсический мегаколон. С 2003 г. отмечается рост заболеваемости, смертности и рецидивов CDI, в том числе в результате возникновения новых штаммов *C. difficile*, устойчивых к применяемым антибиотикам. Таким образом, актуальной задачей является разработка новых препаратов для лечения CDI.

Основными факторами вирулентности *C. difficile* служат два экзотоксина, токсин А (TcdA) и токсин В (TcdB), ответственные за развитие симптомов заболевания. В связи с этим применение средств, нейтрализующих действие вырабатываемых токсинов, может являться дополнительной стратегией терапии.

Целью настоящего исследования было получение моноклональных однодоменных антител, нейтрализующих TcdB *C. difficile*.

На первом этапе работы была проведена иммунизация двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*). В качестве иммуногена использовалась мутантная неактивная форма токсина В (aTcdB), полученная путем внесения двух мутаций в глюкозилтрансферазный домен. Цикл иммунизации состоял из 8 инъекций, титр нейтрализующих антител в сыворотке после иммунизации составил 1 : 1350 (рис. 1).

Следующий этап работы включал получение библиотеки однодоменных антител иммунизированного животного с помощью методов геной инженерии. Далее полученную библиотеку обогащали клонами антител, распознающими TcdB, с помощью технологии фагового дисплея. Отбор клонов, связывающих TcdB, проводили с помощью иммуноферментного анализа. Всего было проанализировано 376 индивидуальных клонов. Для дальнейшего анализа было отобрано 20 антител к TcdB, относящихся к разным клонотипам и имеющих уникальные аминокислотные последовательности.

На третьем этапе работы были получены и охарактеризованы препараты 20 отобранных клонов однодоменных антител. Продукцию осуществляли в прокариотической системе экспрессии с последующей очисткой с помощью металл-аффинной хроматографии. Оценка способности антител связываться с TcdB показала, что 16 клонов антител взаимодействуют с TcdB с высокой аффинностью.

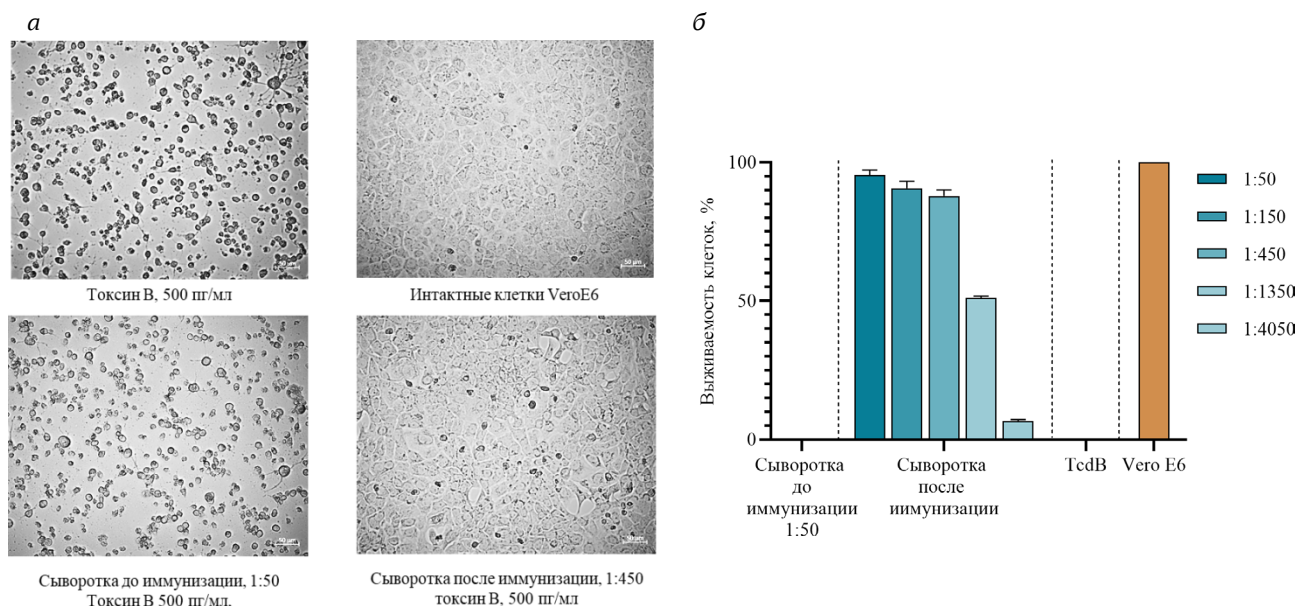


Рис. 1. Анализ нейтрализующих свойств сыворотки верблюда после иммунизации: *а* — фотографии интактных клеток Vero E6, клеток с измененной морфологией под действием токсина В и клеток, обработанных токсином В после инкубации с сывороткой; *б* — определение титра нейтрализующих антител в сыворотке верблюда после иммунизации

Далее была изучена нейтрализующая активность полученных однодоменных антител в отношении TcdB *in vitro* на культуре клеток Vero E6. Проводили анализ способности антител подавлять цитотоксическое действие токсина и препятствовать изменению морфологии клеток, вызванному повреждениями цитоскелета под воздействием TcdB. Было обнаружено, что 3 клона антител обладают высокой нейтрализующей активностью — A3.2, F12.2 и E12.3. Данные клоны нейтрализовали действие токсина с полумаксимальной ингибирующей концентрацией 29,9; 18,7 и 34,7 нМ соответственно (рис. 2).

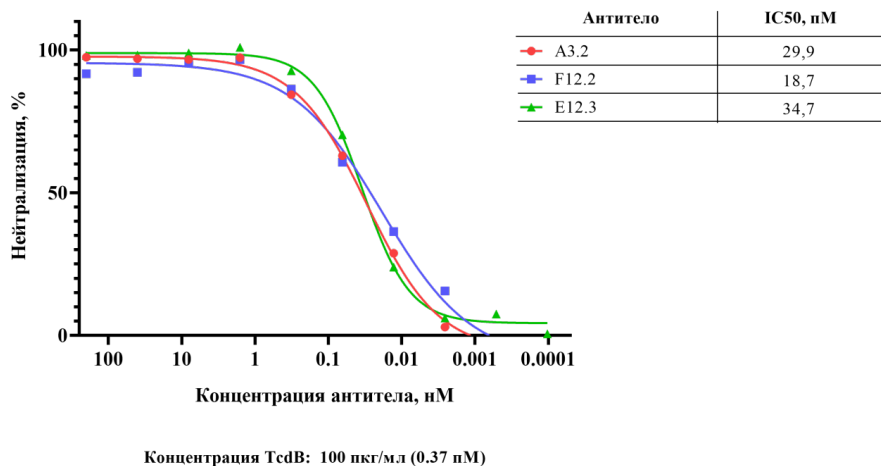


Рис. 2. Определение нейтрализующей активности моноклональных однодоменных антител *in vitro*. Оценку выживаемости проводили по измерению уровня АТФ в клетках через 72 ч после добавления к клеткам токсина В, инкубированного с антителами, в концентрации 100 пг/мл

Таким образом, в результате работы были получены 3 клона однодоменных антител, обладающих высокой нейтрализующей активностью в отношении TcdB *Clostridioides difficile*. В дальнейшем полученные моноклональные однодоменные антитела могут стать основой для разработки средства терапии и профилактики ассоциированной с *Clostridioides difficile* инфекции.