© Коллектив авторов, 2021

Романенко Я.О., Марьин М.А., Рябко А.К., Карцева А.С., Силкина М.В.,
Зенинская Н.А., Шемякин И.Г., Дятлов И.А., Фирстова В.В.

Токсин-нейтрализующая активность моноклональных антител против летального токсина *Bacillus anthracis*

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, г. Оболensk, Российская Федерация

Резюме

Введение. Сибирская язва – антропоозоонозная инфекция, возбудителем которой является грам-положительная спорообразующая бактерия *Bacillus anthracis*. При желудочно-кишечной и легочной форме заболевания сложно поставить диагноз на ранних этапах заболевания, а на поздних – антибиотикотерапия становится неэффективной, так как патогенез и исход заболевания определяют сибиреязвенные токсины. Ведущую роль в гибели больного играет летальный токсин. Одним из способов нейтрализации токсина сибирской язвы является применение моноклональных антител (МкАт), специфичных к субъединицам летального токсина (ЛТ): протективному антигену (ПА) или летальному фактору (ЛФ).

Цель исследования – охарактеризовать и оценить токсин-нейтрализующую активность МкАт в отношении летального токсина *B. anthracis* в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Материал и методы. Для осуществления данной работы в прокариотической системе экспрессии были получены субъединицы ЛТ – полноразмерные протективный антиген (рПА) и летальный фактор (рЛФ). Были получены мышиные МкАт 1D6F10, 4F6F8, 9D5C9 и 1E10, специфичные к ПА, которые были наработаны *in vivo* в асцитической жидкости. Выделение иммуноглобулиновой фракции из асцитической жидкости проводили посредством аффинной хроматографии на колонке с сорбентом Protein G Sepharose. Были определены доменная принадлежность и подкласс МкАт. Для выявления наиболее перспективного токсин-нейтрализующего МкАт нами были проведены эксперименты *in vivo* и *in vitro*: на лабораторных мышах линии BALB/c и на клеточной линии макрофагов мыши J774A.1 соответственно. Жизнеспособность клеток *in vitro* оценивали при помощи МТТ-теста.

Результаты. В результате проведенных экспериментов было выбрано наиболее перспективное МкАт против IV домена ПА – 1E10. В эксперименте *in vitro* с применением клеточной мышиной макрофагоподобной линии J774A.1 было показано, что МкАт 1E10 в концентрации 1,25 мкг/мл и выше способно нейтрализовать ЛТ в дозе IC₅₀. В экспериментах *in vivo* на мышах линии BALB/c было установлено, что МкАт 1E10 в дозе 100 мкг/мышь защищает 100 % животных от гибели при последующем введении 4LD₅₀ ЛТ.

Заключение. Таким образом, МкАт 1E10 является перспективным для получения на его основе химерного МкАт, нейтрализующего ЛТ *B. anthracis*, со сниженной иммуногенностью для людей. Можно предположить, что МкАт 1E10 ингибирует 1-й этап сборки ЛТ – взаимодействие ПА с поверхностными рецепторами эукариотических клеток и, таким образом, может оказывать токсин-нейтрализующее действие.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*; моноклональные антитела; летальный токсин; протективный антиген; летальный фактор; токсин-нейтрализующая активность

Статья получена 08.12.2020. Принята в печать 16.03.2021.

Для цитирования: Романенко Я.О., Марьин М.А., Рябко А.К., Карцева А.С., Силкина М.В., Зенинская Н.А., Шемякин И.Г., Дятлов И.А., Фирстова В.В. Токсин-нейтрализующая активность моноклональных антител против летального токсина *Bacillus anthracis*. Иммунология. 2021; 42 (3): 232–242. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-3-232-242>

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора (Регистрационный номер 116030310014).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Романенко Яна Олеговна –
младший научный сотрудник
лаборатории молекулярной биологии
ФБУН «ГНЦ прикладной
микробиологии и биотехнологии»
Роспотребнадзора,
Оболensk, Российская Федерация
E-mail: muntian.jana@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1698-6516>

Romanenko Ya.O., Marin M.A., Riabko A.K., Kartseva A.S., Silkina M.V.,
Zeninskaya N.A., Shemyakin I.G., Dyatlov I.A., Firstova V.V.

Toxin neutralizing activity of monoclonal antibodies against *Bacillus anthracis* lethal toxin

State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology of Federal Service of Surveillance in the Field of Consumer Right Protection & Human Welfare, 142279, Obolensk, Russian Federation

Abstract

Introduction. Anthrax is an infection caused by a Gram-positive, spore-forming bacteria *Bacillus anthracis*. It is difficult to diagnose the early stages of disease at the gastrointestinal or pulmonary forms, and in the later stages antibiotic therapy becomes ineffective since the pathogenesis and outcome of the disease are determined by anthrax toxins. The lethal toxin plays the leading role in the death of the patients. One way to neutralize anthrax toxin is to use monoclonal antibodies specific to the lethal toxin (LT) subunits: protective antigen (PA) or lethal factor (LF).

Aim of the study – to characterize and evaluate the toxin neutralizing activity of monoclonal antibodies (MAbs) against the lethal toxin of *B. anthracis* *in vitro* and *in vivo*.

Material and methods. MAbs 1D6F10, 4F6F8, 9D5C9 and 1E10 specific to PA were obtained and were generated *in vivo* in ascitic fluid. The immunoglobulin fraction from ascitic fluid was isolated by affinity chromatography on a column with Protein G Sepharose sorbent. The domain specificity and subclass of MAbs were determined. To identify the most promising toxin neutralizing MAbs we performed *in vivo* and *in vitro* experiments: on laboratory BALB/c mice and on murine macrophage cell line J774A.1, respectively. Cell viability *in vitro* was assessed using the MTT-test.

Results. As a result of the made experiments the most promising MAb 1E10 was chosen from all panel of obtained MAbs. MAb 1E10 interacts with IV domain of PA. It was shown that MAb 1E10 in concentration from 1 µg/ml and above in an experiment *in vitro* with murine macrophage cell line J774A.1 neutralizes LT of *B. anthracis*. It was found that MAb 1E10 at a dose of 100 µg/mouse protects 100 % of animal from death upon subsequent administration of 4LD₅₀ LT in an experiments *in vivo* with BALB/c mice. MAb 1E10 is perspective for receiving on its basis of chimeric MAbs with reduced immunogenicity for human.

Conclusion. It can be assumed that MAb 1E10 inhibits the 1st stage of LT assembly – the interaction of PA with surface receptors of eukaryotic cells, and thus can have a toxin neutralizing effect.

Keywords: *Bacillus anthracis*, monoclonal antibodies; lethal toxin; protective antigen; lethal factor; toxin neutralizing activity

Received 08.12.2020. Accepted 16.03.2021.

For citation: Romanenko Ya.O., Marin M.A., Riabko A.K., Kartseva A.S., Silkina M.V., Zeninskaya N.A., Shemyakin I.G., Dyatlov I.A., Firstova V.V. Toxin neutralizing activity of monoclonal antibodies against *Bacillus anthracis* lethal toxin. Immunologiya. 2021; 42 (3): 232–42. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-3-232-242> (in Russian)

Funding. The work was supported by the Sectoral Scientific Program of the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Registration number 116030310014).

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

For correspondence

Yana O. Romanenko – Junior Researcher
of Laboratory of Molecular biology,
SRC for Applied Microbiology &
Biotechnology
of the Rospotrebnadzor,
Obolensk, Russian Federation
E-mail: muntian.jana@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1698-6516>

Введение

По данным Роспотребнадзора, ежегодно регистрируются единичные случаи заболеваний сибирской язвой. Однако на территории Российской Федерации насчитывается свыше 35 тыс. стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов, из них около 8 тыс. сибиреязвенных скотомогильников. Максимальное количество сибиреязвенных скотомогильников приходится на Приволжский, Центральный и Южный федеральные округа

Российской Федерации [1]. В связи с этим в стране сохраняется неблагоприятная эпидемиологическая обстановка по сибиреязвенной инфекции. Подтверждением является вспышка сибирской язвы в июле-августе 2016 г. на территории Ямальского района Ямало-Ненецкого автономного округа, приведшая к заболеванию 36 человек, в том числе 18 детей, с 1 летальным исходом [2]. Также не стоит забывать о странах, граничащих с РФ. Например, по данным Роспотребнадзора, с начала 2018 г.

на территории Китайской Народной Республики зарегистрировано 106 случаев сибирской язвы среди населения. В связи с подобными вспышками в близлежащих государствах возникает угроза завоза инфекции на территорию РФ [3].

Кроме того, споры сибирской язвы могут быть использованы в качестве биологического оружия. Экспертами Всемирной организации здравоохранения вычислено, что через 3 дня после применения 50 кг спор возбудителя сибирской язвы на протяжении 2-километровой зоны по направлению ветра в сторону города с населением 500 тыс. человек поражение инфекцией возникнет у 125 тыс. жителей, из них впоследствии погибнет 95 тыс. человек [4, 5].

Самой распространенной формой заболевания является кожная. Входные ворота инфекции – микротравмы и повреждения кожных покровов. Кожная форма эффективно лечится антибиотиками, однако лечению плохо поддаются легочная или кишечная формы заболевания, которые усугубляются сложностью постановки диагноза. На поздних стадиях сибиреязвенной инфекции терапия антибиотиками становится неэффективной и больной погибает в течение 24 ч из-за накопления в крови большого количества летального токсина (ЛТ), что приводит к развитию шокового состояния с последующим летальным исходом [6]. При генерализованной форме сибиреязвенной инфекции эффективной может быть только специфическая терапия, направленная против токсинов. Одним из возможных препаратов могут быть моноклональные антитела (МкАт) против ЛТ сибирской язвы. Нами был получен ряд МкАт мыши против ПА *Bacillus anthracis*, которые в перспективе могут быть использованы для антитоксической терапии при лечении сибиреязвенной инфекции после их доработки (химеризации, гуманизации).

Материал и методы

Получение и очистка рекомбинантного летального токсина. Рекомбинантные белки – субъединицы ЛТ *B. anthracis* – полноразмерный протективный антиген (рПА) [7] и летальный фактор (рЛФ) [8], а также GST-содержащий III домен и 6His-несущий IV домен ПА (рПА III и рПА IV), получили в прокариотической системе экспрессии. Продуценты рекомбинантных белков получали, трансформируя штамм *E. coli* BL21(DE3) экспрессионными плазмидами pET22b-PA, pET22b-LF, pET22b-PAIII и pET22b-PAIV. Трансформанты высевали на твердую агаризованную среду на основе 2xYT, содержащую 1 % глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина. Полученные трансформанты наращивали в жидкой среде 2xYT, содержащей 0,1 % глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина, при 37 °C до достижения оптимальной оптической плотности культуры. Экспрессию белка индуцировали добавлением 0,4 mM изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) и проводили накопление продукта при 30 °C в течение 6 ч. Бактериальную биомассу собирали центрифугированием. Очистку осветленного центрифугированием лизата проводили

на колонке, набитой сорбентом cOmplete™ His-Tag Purification Resin (Roche, Германия), с последующей доочисткой на гель-фильтрационной колонке Superdex 200 (GE Healthcare, Великобритания). Эффективность очистки проверяли с помощью электрофореза в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях.

Получение и очистка МкАт к протективному антигену *Bacillus anthracis*. Для получения МкАт, специфичных к ПА, мышей линии BALB/c иммунизировали по следующей схеме: вводили подкожно рПА в дозе 100 мкг/мышь с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ), через 2 нед повторно иммунизировали в дозе 100 мкг/мышь с неполным адъювантом Фрейнда (НАФ), спустя 2 нед мышей реиммунизировали в дозе 100 мкг/мышь рПА без адъюванта. На 3-и сутки после последней иммунизации проводили гибридизацию спленцитов гипериммунных мышей ($1 \cdot 10^8$ клеток) по методу Келера и Мильштейна с партнером для слияния – клетками мышинной миеломы линии Sp2/0-Ag14 ($1 \cdot 10^7$ клеток). В качестве агента для слияния применяли раствор полиэтиленгликоля в диметилсульфоксиде. Слившиеся клетки рассеивали в лунки культуральных планшетов с заранее подготовленным фидерным слоем. После гибридизации проводили селекцию с применением НАТ, скрининг, клонирование и криоконсервацию гибридных клеток. Было проведено 2 гибридизации. В результате 1-й получили МкАт 1E10 и 1D6F10 [7]. В результате 2-й гибридизации были получены МкАт 4F6F8 и 9D5C9. Все МкАт наращивали *in vivo* в асцитической жидкости в мышах. Выделение фракции иммуноглобулинов из асцитической жидкости проводили с помощью аффинной хроматографии на колонке с сорбентом Protein G Sepharose (GE Healthcare, Великобритания) с последующей доочисткой на колонке Superdex 200. Эффективность очистки проверяли с помощью электрофореза в 10 % ПААГ в денатурирующих условиях.

Определение доменной и классовой принадлежности МкАт. Оценку иммунологической специфичности МкАт проводили методом иммуноблота (вестерн-блоттинга) с рекомбинантным белком ПА *B. anthracis*, а также III и IV доменами ПА для определения доменной специфичности МкАт, проявляющих активность в отношении рПА. Рекомбинантные белки подвергали электрофорезу в 10 % ПААГ, после чего осуществляли горизонтальный перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra (GE Healthcare, Великобритания) в системе быстрого полусухого переноса Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, США). После завершения переноса мембрану блокировали, погружая в обезжиренное молоко с массовой долей жира не более 0,5 % и инкубируя в течение 1 ч на орбитальном термостатируемом шейкере при 300 об/мин и температуре 37 °C. Для промывки мембран использовали фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с добавлением 0,05 % Твин-20 (ФСБ-Т) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Блокированные и промытые мембраны разрезали на полоски так, чтобы

Рис. 1. Специфическая активность моноклональных антител по отношению к полноразмерному протективному антигену (ПА), III и IV доменам ПА *B. Anthracis*

А – результаты электрофоретического разделения белков в 10 % ПААГ, окраска Кумасси R-250; 1 – маркеры молекулярных масс SM0671 (Fermentas, США); 2 – рекомбинантный полноразмерный ПА; 3 – рекомбинантный III домен ПА; 4 – рекомбинантный IV домен ПА; Б–Д – результаты вестерн-блот-анализа рекомбинантных белков с детекцией антителами: 1D6F10 (Б); 1E10 (В); 4F6F8 (Г); 9D5C9 (Д); 1 – маркеры молекулярных масс SM0671 (Fermentas, США); 2 – рекомбинантный полноразмерный ПА; 3 – рекомбинантный IV домен ПА; 4 – рекомбинантный III домен ПА.

на каждой присутствовали маркеры молекулярных масс и все исследуемые мишени. Инкубировали каждую полоску отдельно с исследуемыми МкАт в концентрации 1 мкг/мл в ФСБ. Все мембраны инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С. Далее, после 3-кратной промывки буфером ФСБ-Т, полоски инкубировали с пероксидазным конъюгатом к суммарной фракции IgG мыши (Anti-Mouse IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in rabbit, Sigma, США) в разведении 1 : 10 000, затем 4 раза промывали ФСБ-Т. Визуализацию продуктов реакции проводили 0,05 % раствором диаминобензидина (Sigma, США) в ФСБ с добавлением 0,015 % H₂O₂. Реакцию останавливали промывкой дистиллированной водой, мембраны высушивали (рис. 1). Подкласс МкАт определяли в иммунохроматографическом тесте с использованием набора для определения изотипов МкАт мыши (Roche Diagnostic Corporation, США) (рис. 2).

Токсин-нейтрализующая активность МкАт *in vitro*. Тест был проведен на клеточной линии J774A.1 макрофагов мыши. Жизнеспособность клеток оценивали при помощи МТТ-теста (Mosmann, 1983)

[МТТ – тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид]. В лунки 96-луночного планшета вносили макрофаги J774A.1 в концентрации $2 \cdot 10^4$ клеток на лунку, инкубировали 12 ч при 37 °С и 5 % CO₂. В тесте использовали рекомбинантный ЛТ. Для этого смешивали субъединицы ЛТ в концентрации, составляющей IC₅₀: рПА 0,5 мкг/мл и рЛФ 0,1 мкг/мл (концентрация IC₅₀ определена в предварительных экспериментах). Для оценки токсин-нейтрализующей активности МкАт использовали в концентрациях 2,5; 1,25; 0,625 и 0,3125 мкг/мл, что соответствует молярным соотношениям МкАт : рПА – 2,5 : 1; 1,25 : 1; 0,625 : 1 и 0,3125 : 1. ЛТ и МкАт смешивали в концентрациях, 10-кратно превышающих требуемые, выдерживали 30 мин для связывания МкАт с ПА83, а затем добавляли по 10 мкл смеси в лунки с клетками, содержащие по 90 мкл культуральной среды. Для определения токсин-нейтрализующей активности МкАт дополнительно анализировали жизнеспособность клеточной культуры при добавлении 10 мкл чистого ФСБ и принимали жизнеспособность

Рис. 2. Классовая принадлежность моноклональных антител (МкАт)

1 – МкАт 1D6F10; 2 – МкАт 4F6F8; 3 – МкАт 9D5C9; 4 – МкАт 1E10.

клеток в данных лунках за 100 % после инкубации (по показателю OD_{540}). Также в другую группу лунок добавляли по 10 мкл 0,25 % мертиолята натрия и приравнивали их жизнеспособность к 0 %. Кроме того, в качестве контроля в лунки со средой добавляли МкАт 1D6F10, 4F6F8, 9D5C9 против III домена ПА и 1E10 про-

Рис. 3. Токсин-нейтрализующая активность моноклональных антител (МкАт) 1D6F10, 4F6F8, 9D5C9, 1E10 на клеточной линии мышиных макрофагов J774A.1 (по результатам МТТ-теста)

тив IV домена ПА без ЛТ. Время инкубации всех образцов с клетками J774A.1 составило 4 ч. По окончании инкубации во все лунки вносили по 10 мкл раствора МТТ (до конечной концентрации 5 мкг/мл) в ФСБ и инкубировали при тех же условиях в течение ночи. Затем в лунки планшета вносили по 150 мкл диметилсульфоксида для растворения кристаллов формазана и измеряли оптическую плотность при длине волны 540 нм на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США) (рис. 3).

Определение LD_{50} летального токсина на модели *in vivo*. Для определения LD_{50} готовили разведения ЛТ (рПА/рЛФ = 1/1), начиная с 24 мкг/мышь (по общему белку) до 4 мкг/мышь с 2-кратным шагом разведения. Полученные растворы вводили мышам линии BALB/c (по 9 мышей в группе) в ретроорбитальную вену глаза. Контрольная группа получала инъекции чистого ФСБ. Учет гибели животных проводили 1 раз в сутки в течение 14 дней. Значение LD_{50} рассчитывали по формуле Кербера:

$$LD_{50} = LD_{100} - (Z \times D) / M,$$

где D – интервал между каждыми двумя смежными дозами; Z – среднее арифметическое числа животных, у которых наблюдалась учитываемая реакция; M – число животных в каждой группе.

Определение токсин-нейтрализующей активности МкАт *in vivo*. Для определения защитной дозы МкАт, позволяющей нейтрализовать ЛТ, мышам линии BALB/c (по 9 голов в группе) вводили МкАт 1D6F10, 4F6F8, 9D5C9 против III домена ПА и 1E10 против IV домена ПА в дозах 25, 50 и 100 мкг/мышь. Через 24 ч после введения МкАт мышам внутрибрюшинно вводили ЛТ в дозе $4LD_{50}$ (50 мкг/мышь ЛТ, рПА/рЛФ=1/1). Учет гибели животных проводили 1 раз в сутки в течение 14 дней. Для достоверности результатов брали 5 контрольных групп животных. 1-й контрольной группе животных (по 9 голов в группе) вводили инъекцию чистого ЛТ (50 мкг/мл рПА / 50 мкг/мл рЛФ = 1/1). Другим контрольным группам животных (по 9 голов в группе) вводили одно из исследуемых МкАт в максимальной концентрации 100 мкг/мышь (рис. 4–7).

Оценка длительности циркуляции МкАт *in vivo*. Мышей линии BALB/c разделили на 2 группы по 9 животных. 1-й группе животных вводили перитонеально МкАт в разных концентрациях (100, 500, 1000 мкг/мышь в ФСБ, по 3 мыши в подгруппе), 2-й контрольной группе вводили чистый ФСБ. Чтобы оценить длительность циркуляции введенного антитела в кровяном русле, у животных из ретроорбитальной вены глаза отбирали кровь на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 и 21-е сутки. Для определения титров антител в крови у животных проводили непрямой твердофазный иммуноферментный анализ. В лунки 96-луночного полистиролового планшета вносили по 100 мкл раствора с рПА в концентрации 1 мкг/мл на лунку в ФСБ и инкубировали при температуре 37 °C в течение 2 ч на планшетном орбитальном шейкере (Elmi, Латвия) при скорости вращения платформы 370 об/мин. Трижды отмывали ФСБ-Т, каждый раз внося в лунки планшета по 200 мкл

Рис. 4. Токсин-нейтрализующая активность моноклональных антител (МкАт) 1D6F10 на модели *in vivo*

отмывающего раствора. Затем свободные валентности пластика блокировали молоком с массовой долей жира не более 0,5 %, внося по 200 мкл на лунку, и инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 ч при тех же условиях. Трижды отмывали ФСБ-Т. Далее во все 1-е лунки ряда вносили кровь в разведении 1 : 100 в 2-кратном повторе, титровали в вертикальных рядах с 2-кратным шагом и инкубировали при тех же условиях, после чего отмывали 3 раза. Добавляли в лунки конъюгат кроличьих антител против IgG мыши с пероксидазой хрена в разведении 1 : 10 000. Планшет инкубировали при температуре 37 °С в течение 40 мин на шейкере, затем 6 раз отмывали ФСБ-Т. После этого в лунки вносили по 100 мкл субстрат-индикаторного раствора (10 мкл 30 % H₂O₂ и 8 мг ортофенилендиамина на 10 мл фосфатно-цитратного буфера pH 5,0). Положительную реакцию оценивали по появлению желто-коричневого окрашивания раствора. Реакцию останавливали добавлением в лунки по 50 мкл 4N серной кислоты. Детекцию проводили на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США) при длине волны 492 нм (рис. 8). Предельным титром считали такое разведение сыворотки крови животных, значение оптической плотности для которого превышало таковое в лунках с отрицательным контролем как минимум в 2 раза.

Время полувыведения антител рассчитывали по формуле:

$$T_{1/2} = (t_2 - t_1) \times \ln \times (2) / \ln \times ([C_1 - C_2]),$$

где $T_{1/2}$ – время полувыведения МкАт из организма животных; t_2 и t_1 – время в точках 2 и 1, соответственно; C_1 и C_2 – титры специфических МкАт в сыворотке крови животных в точках 1 и 2, соответственно.

Рассчитывали значение $T_{1/2}$ для каждой вводимой животным концентрации, после чего находили среднее арифметическое.

Рис. 5. Токсин-нейтрализующая активность моноклональных антител (МкАт) 4F6F8 на модели *in vivo*

ЛТ – летальный токсин.

Результаты

Определение доменной и классовой принадлежности МкАт

На основании данных иммуноблоттинга с использованием МкАт со специфической активностью против полноразмерного ПА было выявлено, что гибридомы 1D6F10, 4F6F8 и 9D5C9 синтезировали антитела против III домена ПА, гибридома 1E10 синтезировала антитела против IV домена ПА (см. рис. 1).

Результаты иммунохроматографического теста показали, что МкАт 1D6F10, 4F6F8, 9D5C9 против III домена ПА и МкАт 1E10 против IV домена ПА относятся к иммуноглобулинам G, изотипу G1 (см. рис. 2).

Токсин-нейтрализующая активность МкАт 1D6F10, 4F6F8, 9D5C9 против III домена ПА и 1E10 против IV домена ПА на модели *in vitro*

Сравнительный анализ токсин-нейтрализующей активности на клеточной линии J774A.1 позволил выявить наиболее перспективное МкАт: МкАт 1E10 в концентрациях от 1,25 мкг/мл нейтрализовало ЛТ. При этой концентрации жизнеспособность клеток J774A.1 составила 73 %, а при концентрации МкАт 1E10 2,5 мкг/мл – 99 %. Токсин-нейтрализующее действие МкАт 4F6F8 началось от концентрации 1,25 мкг/мл, при которой жизнеспособность клеток J774A.1 составила 60 %, а при концентрации 2,5 мкг/мл – 82 %. МкАт 1D6F10 в концентрации 1,25 мкг/мл не блокировало действие ЛТ. Жизнеспособность клеток J774A.1 составила 47 %, при увеличении концентрации МкАт 1D6F10 до 2,5 мкг/мл – 57 %. МкАт 9D5C9 не обладает токсин-нейтрализующей активностью даже при максимальной концентрации 2,5 мкг/мл, жизнеспособность клеток J774A.1 составила 19,5 %. При этом МкАт не является токсичным для линии J774A.1, о чем свидетельствует 100 % выживаемость клеток без ЛТ в среде с добавле-

Рис. 6. Токсин-нейтрализующая активность моноклональных антител (МкАт) 9D5C9 на модели *in vivo*

нием максимальной исследуемой концентрации МкАт 9D5C9. Это свидетельствует о потенцирующем эффекте МкАт 9D5C9, которое усиливает действие ЛТ (см. рис. 3).

Токсин-нейтрализующая активность МкАт 1D6F10 против III домена ПА на модели *in vivo*

О токсин-нейтрализующей активности МкАт 1D6F10 судили по выживаемости мышей после введения им ЛТ в дозе $4LD_{50}$. За сутки до введения токсина мышам внутривенно вводили МкАт в дозах от 25 до 100 мкг/мышь. Высокая эффективность нейтрализации ЛТ была выявлена только при концентрации МкАт 1D6F10 100 мкг/мышь – выживаемость животных составила 70 %. При введении МкАт 1D6F10 в концентрации 50 мкг/мышь наблюдалась незначительная токсин-

Рис. 8. Длительность циркуляции моноклональных антител (МкАт) 1E10 против IV домена протективного антигена (ПА) в крови животных

Рис. 7. Токсин-нейтрализующая активность моноклональных антител (МкАт) 1E10 на модели *in vivo*

нейтрализующая активность – выживаемость животных составила лишь 30 %. При введении МкАт в концентрации 25 мкг/мышь все животные пали на 3-и сутки (см. рис. 4).

Токсин-нейтрализующая активность МкАт 4F6F8 против III домена ПА на модели *in vivo*

На основании данных о выживаемости мышей после введения им ЛТ в дозе $4LD_{50}$ было выявлено, что МкАт 4F6F8 обладает низкой токсин-нейтрализующей активностью, при повышении концентрации наблюдается увеличение продолжительности жизни животных. При введении МкАт в концентрации 25 мкг/мышь все мыши пали на 1-е сутки. При введении МкАт в концентрации 50 мкг/мышь животные пали на 4-е сутки. Введение МкАт в концентрации 100 мкг/мышь увеличивало продолжительности жизни животных до 10 суток (см. рис. 5).

Токсин-нейтрализующая активность МкАт 9D5C9 против III домена ПА на модели *in vivo*

На основании данных о выживаемости мышей после введения им ЛТ в дозе $4LD_{50}$ было выявлено, что МкАт 9D5C9 ни в одной из концентраций не защищало мышей от гибели. При введении МкАт 9D5C9 все животные гибли в 1-е сутки эксперимента, как и мыши контрольной группы, которым вводили только ЛТ в концентрации $4LD_{50}$ (см. рис. 6).

Токсин-нейтрализующая активность МкАт 1E10 против IV домена ПА на модели *in vivo*

Было выявлено, что введение МкАт 1E10 обладает нейтрализующей активностью в отношении ЛТ *B. anthracis*. При введении МкАт в дозе 100 мкг/мышь выживаемость животных составила 100 %, при введении МкАт в дозе 50 мкг/мышь – 70 %, при введении МкАт в дозе 25 мкг/мышь все животные пали на 1-е сутки (см. рис. 7).

Оценка длительности циркуляции МкАт 1Е10 против IV домена ПА на модели *in vivo*

МкАт 1Е10 показало наиболее эффективную токсин-нейтрализующую активность и была проанализирована длительность его циркуляции в кровяном русле мышей. Как и ожидалось, максимальное количество МкАт 1Е10 обнаруживалось на 1-е сутки. В последующие сроки проведения анализа концентрация антител снижается и на 21-й день после введения МкАт 1Е10 в дозе 100 мкг/мышь титр этих антител в сыворотке крови составил 1 : 200. При введении МкАт в более высоких дозах (500 и 1000 мкг/мышь) титры антител к 21-му дню после их введения составили 1 : 400 и 1 : 800 соответственно (см. рис. 8). Титры специфических антител у мышей контрольной группы не регистрировались. Рассчитанное время полувыведения для МкАт 1Е10 составило 4,33 суток.

Обсуждение

Бактерии *Bacillus anthracis* продуцируют термолabile белки: ПА (82,7 кДа), ЛФ (90,2 кДа) и отечный фактор (ОФ) (89 кДа) [9, 10]. ПА в комбинации с ЛФ образуют ЛТ – основной фактор патогенности возбудителя сибирской язвы, обеспечивающий летальность при сибиреязвенной инфекции [11]. ПА является центральным компонентом белкового токсина, каждый состоит из 4 структурных независимых доменов. Основная функция домена I заключается в связывании ПА с ЛФ. Домен II участвует в формировании петли, которая в дальнейшем встраивается в мембрану и образует катион-селективный канал. Домен III участвует в олигомеризации ПА и связывании олигомерной структуры с ЛФ и/или ОФ. Функция домена IV заключается в связывании ПА с рецепторами на поверхности эукариотических клеток [12, 13]. На 1-м этапе ПА с участием домена IV связывается с рецепторами на поверхности эукариотических клеток, и сразу после этого полноразмерный ПА с молекулярной массой 83 кДа расщепляется фурин-подобными протеазами клетки хозяина с образованием ПА63 (63 кДа) и ПА20 (20 кДа) [13]. ПА63 начинают олигомеризоваться с участием домена III ПА, образуя гептамерные или октамерные структуры, называемые препорами. С одним гептамером связываются 3 молекулы ЛФ и/или ОФ, а с одним октамером – 4 молекулы ЛФ и/или ОФ. С помощью домена I ПА связывается с ЛФ и/или ОФ, образуя ЛТ или отечный токсин (ОТ), который в дальнейшем проникает в клетку с помощью клатрин-зависимого эндоцитоза. Таким образом происходит формирование эндосомы. Содержимое эндосомы постепенно закисляется, вследствие чего ПА изменяет свою конформацию и встраивается в мембрану эндосомы. Это приводит к формированию истинной поры. С участием доменов I и II происходит транслокация ЛФ или ОФ через истинную пору в цитозоль эукариотической клетки. Проявление токсического действия ЛТ осуществляется за счет расщепления летальным фактором МАРК-киназ, что в дальнейшем приводит к апоптозу [14–16]. Учитывая, что ЛТ проявляет свои

токсические свойства только в собранном виде, можно предположить, что антитела, ингибирующие любой из этап сборки токсина, будут характеризоваться токсин-нейтрализующими свойствами.

Известно множество работ, в которых описано получение мышинных МкАт, нейтрализующих ЛТ *B. anthracis*. Так, в работе С.Д. Kelly-Cirino и N.J. Mantis [17] описано получение пула МкАт против доменов III и IV ПА. Авторы подробно исследовали 3 клон МкАт: 2-А7 со специфичностью к III домену ПА, 1-Е1 и 2-В12 к домену IV ПА. МкАт к домену III ПА не показало никакой нейтрализующей активности как в тесте *in vitro*, так и в тесте *in vivo*. МкАт 1-Е1 в тесте *in vitro* показало токсин-нейтрализующую активность 50 % в концентрации 0,2 мкг/мл и 100 % – в концентрации более 0,7 мкг/мл в отношении 60 нг ЛТ. МкАт 2-В12 в том же тесте проявило меньшую активность: потребовалась концентрация МкАт 0,4 мкг/мл для 50 % защиты клеток, а максимальная токсин-нейтрализующая активность не превышала 90 % даже при использовании МкАт в концентрации 2,5 мкг/мл и выше. При проведении теста на нейтрализацию ЛТ *in vivo* МкАт в количестве 550 мкг/мышь вводили через 5 мин после инъекции ЛТ в дозе 100 мкг/мышь. По истечении срока наблюдения (80 ч) в группе, которой вводили МкАт 1-Е1 совместно с ЛТ, выживаемость составила 40 %, при этом МкАт 2-В12 защищало лабораторных животных лучше – выживаемость на конец эксперимента зафиксирована на уровне 60 %.

Е. Brossier и соавт. [18] также получили мышинные МкАт, нейтрализующие действие ЛТ возбудителя сибирской язвы. Полученные *in vitro* результаты (МТТ-тест) свидетельствуют о 100 % токсин-нейтрализующем эффекте МкАт 7.5 (специфичны к домену IV ПА) в концентрации 10 мкг/мл и МкАт 48.3 (специфичны к домену III ПА) в концентрации 1 мкг/мл при преинкубировании указанных МкАт с ЛТ (500 нг/мл ПА + 1 мкг/мл ЛФ) в течение 1 ч. В данной работе тест *in vivo* был проведен на аутбредных мышах линии OF1 с заражением животных штаммом *B. anthracis* Sterne (10 LD₅₀) через 16 ч после введения исследуемых МкАт. Максимальный протективный эффект достигался при введении МкАт 7.5 или 48.3 по отдельности в количестве 100 мкг/мышь или при сочетанном введении обоих МкАт в количестве по 10 мкг/мышь каждого – достигнута 75 % выживаемость животных. Полностью защитить животных от заражения штаммом Sterne удалось лишь при сочетании обоих указанных МкАт против ПА и одного нейтрализующего МкАт против рецептор-связывающего эпитопа ЛФ.

Одним из первых охарактеризованных МкАт, нейтрализующих ЛТ *B. anthracis*, было МкАт 14В7 [19, 20]. В МТТ-тесте данное МкАт показывало 50 % токсин-нейтрализующую активность в концентрации 0,32 мкг/мл при использовании ЛТ в концентрации 80 нг/мл ПА + 80 нг/мл ЛФ. В экспериментах на крысах МкАт 14В7 в количестве 40 мкг обеспечивает 100 % выживаемость животных при внутривенном введении им

40 мкг ПА и 8 мкг ЛФ. На основе данного МкАт разработаны химерные и гуманизированные токсин-нейтрализующие МкАт [20].

Установлено, что 3 из 4 полученных и исследованных нами гибридом синтезировали МкАт против домена III ПА (1D6F10, 4F6F8, 9D5C9), 1 гибридома синтезировала МкАт против домена IV ПА (1E10). Все МкАт относятся к иммуноглобулинам G, изотипу G1. Токсин-нейтрализующая активность полученных МкАт сопоставима с описанными выше МкАт, направленными против ПА.

В модельных экспериментах *in vitro* нами было выявлено наиболее перспективное МкАт 1E10 против домена IV ПА, которое нейтрализовало ЛТ (500 нг/мл ПА + 100 нг/мл ЛФ) в наиболее низких по сравнению с другими МкАт концентрациях: МкАт 1E10 в концентрации от 1,25 мкг/мл обеспечивало 100 % жизнеспособность клеток. Гибридома 4F6F8, которая синтезирует МкАт против домена III ПА, нейтрализовала ЛТ в концентрации 2,5 мкг/мл, при этом жизнеспособность клеток составила 82 %.

Токсин-нейтрализующая активность МкАт 1E10 как наиболее перспективного препарата для нейтрализации ЛТ была проанализирована в экспериментах *in vivo* на мышах линии BALB/c. Результаты исследований показали, что внутрибрюшинного введения МкАт 1E10 в дозе 100 мкг/мышь достаточно для предотвращения гибели животных от последующего внутривенного введения ЛТ *B. anthracis* в дозе 4LD₅₀ (50 мкг ПА + 50 мкг ЛФ на мышь).

Для препаратов иммуноглобулинов с потенциальным терапевтическим действием также определяют фармакокинетические параметры, в частности время полувыведения вещества из кровяного русла. Первичные исследования проводят с помощью моделей на лабораторных животных (мышях, крысах, морских свинках, кроликах, обезьянах). В качестве терапевтических МкАт, нейтрализующих токсин возбудителя сибирской язвы, рассматривают, например, полностью человеческие полноразмерные МкАт [21–23], химерные МкАт мышь–человек [20, 24], scFv-фрагменты мышинных МкАт [25], фрагменты мышинных МкАт, конъюгированных с ПЭГ [26], но не полноразмерные мышинные МкАт. Время полувыведения антител (T_{1/2}) зависит от дозы, размера молекулы вещества, места введения и выбранной модели на животных. Так, полноразмерные человеческие МкАт IQNPA и IQNLF при введении мышам в дозе 100 мкг на животное показали T_{1/2}, равное 11,2 и 6,8 дней, соответственно [22]. При интраперитонеальном введении мышам человеческого антитела AVP-21D9 в дозе 1000 мкг/мышь (50 мг/кг) регистрировали время полувыведения 2,8 ± 1,4 дня. При введении этого же МкАт кроликам T_{1/2} варьировало от 5,0 ± 2,7 до 8,9 ± 2,7 дней в зависимости от дозы (1 или 10 мг/кг соот-

ветственно), а в экспериментах на морских свинках – 4,5 ± 1,6 или 13,8 ± 8,1 дней (5 или 50 мг/кг соответственно) [23]. ScFv-фрагменты ожидаемо имеют время полувыведения, измеряемое минутами [25]. Химерное модифицированное МкАт ETI-204, сконструированное на основе мышинного МкАт 14B7 и зарегистрированное как Anthim (Obiltoxaimab), при внутривенном введении кроликам в дозе 10 мг/животное показало T_{1/2} 3,8 ± 0,5 дней или, по другим данным, 1–2 дня [20, 27].

В среднем время циркуляции IgG-антител в организме составляет 21 день. Однако на длительность циркуляции антител большое влияние оказывают посттрансляционные модификации белка. Существенным влиянием на фармакокинетику и фармакодинамику антител оказывают особенности их гликозилирования. В зависимости от особенностей гликозилирования может меняться как аффинность к рецепторам эукариотических клеток и соответственно рецептор-опосредованный клиренс, так и степень защищенности антитела от воздействия протеаз. В связи с этим мы проанализировали длительность циркуляции МкАт 1E10. Введенные мышам МкАт 1E10 выявлялись в организме животных на протяжении минимум 21 дня. Их титры снижались до значений 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800 в соответствии с их начальной дозой (100, 500, 1000 мкг/мышь). Рассчитанное среднее T_{1/2} мышинного МкАт 1E10 составило 4,33 дня, что сравнимо с данными экспериментов на животных для большинства терапевтических человеческих и химерных антител против ПА.

Заключение

На основании результатов экспериментов, проведенных на клеточной линии J774A.1 и на мышах линии BALB/c, выявлено наиболее эффективное токсин-нейтрализующее МкАт 1E10, относящееся к IgG1, направленное против домена IV ПА. Учитывая механизмы сборки ЛТ, можно предположить, что МкАт 1E10 ингибирует 1-й этап сборки ЛТ – взаимодействие ПА с поверхностными рецепторами клеток, и, таким образом, может ингибировать проникновение ЛТ в клетку. Как известно, МкАт мыши являются иммуногенными для человека. С целью получения терапевтического МкАт гибридома, синтезирующая МкАт 1E10, может быть использована для конструирования химерного или гуманизированного МкАт.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Дятлов И.А.; сбор и обработка материала – Романенко Я.О., Силкина М.В., Зенинская Н.А.; статистическая обработка – Карцева А.С.; написание и редактирование текста – Рябко А.К.; ответственность за целостность всех частей статьи – Шемякин И.Г.; утверждение окончательного варианта статьи – Фирстова В.В.

Литература

1. Письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 7 июня 2010 г. № 01/8458-0-32 «О сибиреязвенных скотомогильниках».

2. О ситуации по сибирской язве и мерах профилактики. 10 июля 2020 г. URL: http://70.rospotrebnadzor.ru/epidemiologic_situation/144415/

3. О сибирской язве в Китае. 10 июля 2020 г. URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=9991&sphrase_id=2572722
4. Cieslak T.J., Eitzen E.M. Jr. Clinical and epidemiologic principles of anthrax. *Emerg. Infect. Dis.* 1999; 5 (4): 552–5.
5. Рубинштейн Э. Бioterrorизм: значение антимикробных препаратов. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2001; 4 (3): 290–300.
6. Hughes J.M., Gerberding J.L. Anthrax bioterrorism: lessons learned and future directions. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8 (10): 1013–4.
7. Белова Е.В., Колесников А.В., Захарова М.Ю., Дубилей С.А., Дятлов И.А., Шемякин И.Г. Особенности иммунного ответа на летальный токсин *Bacillus anthracis*. *Биоорганическая химия.* 2008; 34 (5): 639–44.
8. Zakharova M.Yu., Kuznetsov N.A., Dubiley S.A., Kozyr A.V., Fedorova O.S., Chudakov D.M., Knorre D.G., Shemyakin I.G., Gabibov A.G., Kolesnikov A.V. Substrate Recognition of Anthrax Lethal Factor Examined by Combinatorial and Pre-steady-state Kinetic Approaches. *J Biol Chem.* 2009; 284 (27): 17902–13.
9. Smith H. Discovery of the anthrax toxin: the beginning of *in vivo* studies on pathogenic bacteria. *Trends Microbiol.* 2000; 8 (5): 199–200.
10. Aulinger B.A., Roehrl M.H., Mekalanos J.J., Collier R.J., Wang J.Y. Combining anthrax vaccine and therapy: a dominant-negative inhibitor of anthrax toxin is also a potent and safe immunogen for vaccines. *Infect. Immun.* 2005; 73 (6): 3408–14.
11. Petosa C., Collier R.J., Klimpel K.R., Leppla S.H., Liddington R.C. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature.* 1997; 385 (6619): 833–8.
12. Green B.D., Platt P.R., Bailey C.J. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: a newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* 2006; 3 (3): 159–65.
13. Little S.F., Novak J.M., Lowe J.R., Leppla S.H., Singh Y., Klimpel K.R., Friedlander A.M. Characterization of lethal factor binding and cell receptor binding domains of protective antigen of *Bacillus anthracis* using monoclonal antibodies. *Microbiology.* 1996; 142 (3): 707–15.
14. Liu S., Zhang Y., Hoover B., Leppla S.H. The receptors that mediate the direct lethality of anthrax toxin. *Toxins (Basel).* 2012; 5 (1): 1–8.
15. Kirby J.E. Anthrax lethal toxin induces human endothelial cell apoptosis. *Infect. Immun.* 2004; 72 (1): 430–9.
16. Comer J.E., Chopra A.K., Peterson J.W., König R. Direct inhibition of T-lymphocyte activation by anthrax toxins *in vivo*. *Infect. Immun.* 2005; 73 (12): 8275–81.
17. Kelly-Cirino C.D., Mantis N.J. Neutralizing monoclonal antibodies directed against defined linear epitopes on domain 4 of anthrax protective antigen. *Infect. Immun.* 2009; 77 (11): 4859–67.
18. Brossier F., Lévy M., Landier A., Lafaye P., Mock M. Functional analysis of *Bacillus anthracis* protective antigen by using neutralizing monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 2004; 72 (11): 6313–7.
19. Little S.F., Leppla S.H., Cora E. Production and characterization of monoclonal antibodies to the protective antigen component of *Bacillus anthracis* toxin. *Infect. Immun.* 1988; 56 (7): 1807–13.
20. Mohamed N., Clagett M., Li J., Jones S., Pincus S., D'alia G., Nardone L., Babin M., Spitalny G., Casey L. A high-affinity monoclonal antibody to anthrax protective antigen passively protects rabbits before and after aerosolized *Bacillus anthracis* spore challenge. *Infect. Immun.* 2005; 73 (2): 795–802.
21. Mazumdar S. Raxibacumab. *MAbs.* 2009; 1 (6): 531–8.
22. Albrecht M.T., Li H., Williamson D., LeButt C.S., Flick-Smith H.C., Quinn C.P. et al. Human monoclonal antibodies against anthrax lethal factor and protective antigen act independently to protect against *Bacillus anthracis* infection and enhance endogenous immunity to anthrax. *Infect. Immun.* 2007; 75 (11): 5425–33.
23. Peterson J.W., Comer J.E., Noffsinger D.M., Wenglikowski A., Walberg K.G., Chatuev B.M. Human monoclonal anti-protective antigen antibody completely protects rabbits and is synergistic with ciprofloxacin in protecting mice and guinea pigs against inhalation anthrax. *Infect. Immun.* 2006; 74 (2): 1016–24.
24. Hou A.W., Morrill A.M. Obiltoxaximab: adding to the treatment arsenal for *Bacillus anthracis* infection. *Ann. Pharmacother.* 2017; 51 (10): 908–13.
25. Maynard J.A., Maassen C.B.M., Leppla S.H., Brasky K., Patterson J.L., Iverson B.L. Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. *Nat. Biotechnol.* 2002; 20 (6): 597–601.
26. Mabry R., Rani M., Geiger R., Hubbard G.B., Carrión R. Jr, Brasky K. Passive protection against anthrax by using a high-affinity antitoxin antibody fragment lacking an Fc region. *Infect. Immun.* 2005; 73 (12): 8362–8.
27. Greig S.L. Obiltoxaximab: first global approval. *Drugs.* 2016; 76 (7): 823–30.

References

1. Letter No. 01/8458-0-32 of the Federal Service for Supervision of Consumer Protection and Human Welfare dated June 7, 2010 «About anthrax cattle trucks». (in Russian)
2. About the anthrax situation and prevention measures. July 10, 2020. URL: http://70.rospotrebnadzor.ru/epidemiologic_situation/144415/ (in Russian)
3. About anthrax in China. July 10, 2020. URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=9991&sphrase_id=2572722 (in Russian)
4. Cieslak T.J., Eitzen E.M. Jr. Clinical and epidemiologic principles of anthrax. *Emerg. Infect. Dis.* 1999; 5 (4): 552–5.
5. Rubinshteyn E. Bioterrorism: the importance of antimicrobial drugs. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimirnaya khimioterapiya.* 2001; 4 (3): 290–300. (in Russian)
6. Hughes J.M., Gerberding J.L. Anthrax bioterrorism: lessons learned and future directions. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8 (10): 1013–14.
7. Belova E.V., Kolesnikov A.V., Zakharova M.Y., Dubiley S.A., Dyatlov I.A., Shemyakin I.G. Special features of immune response to the lethal toxin of *Bacillus anthracis*. *Bioorganicheskaya khimiya.* 2008; 34 (5): 571–7. (in Russian)
8. Zakharova M.Y., Kuznetsov N.A., Dubiley S.A., Kozyr A.V., Fedorova O.S., Chudakov D.M., Kolesnikov A.V. Substrate recognition of anthrax lethal factor examined by combinatorial and pre-steady-state kinetic approaches. *J Biol Chem.* 2009; 284 (27): 17902–13.
9. Smith H. Discovery of the anthrax toxin: the beginning of *in vivo* studies on pathogenic bacteria. *Trends Microbiol.* 2000; 8 (5): 199–200.
10. Aulinger B.A., Roehrl M.H., Mekalanos J.J., Collier R.J., Wang J.Y. Combining anthrax vaccine and therapy: a dominant-negative inhibitor of anthrax toxin is also a potent and safe immunogen for vaccines. *Infect. Immun.* 2005; 73 (6): 3408–14.
11. Petosa C., Collier R.J., Klimpel K.R., Leppla S.H., Liddington R.C. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature.* 1997; 385 (6619): 833–8.
12. Green B.D., Platt P.R., Bailey C.J. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: a newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* 2006; 3 (3): 159–65.
13. Little S.F., Novak J.M., Lowe J.R., Leppla S.H., Singh Y., Klimpel K.R., Friedlander A.M. Characterization of lethal factor binding and cell receptor binding domains of protective antigen of *Bacillus anthracis* using monoclonal antibodies. *Microbiology.* 1996; 142 (3): 707–15.
14. Liu S., Zhang Y., Hoover B., Leppla S.H. The receptors that mediate the direct lethality of anthrax toxin. *Toxins (Basel).* 2012; 5 (1): 1–8.
15. Kirby J.E. Anthrax lethal toxin induces human endothelial cell apoptosis. *Infect. Immun.* 2004; 72 (1): 430–9.
16. Comer J.E., Chopra A.K., Peterson J.W., König R. Direct inhibition of T-lymphocyte activation by anthrax toxins *in vivo*. *Infect. Immun.* 2005; 73 (12): 8275–81.
17. Kelly-Cirino C.D., Mantis N.J. Neutralizing monoclonal antibodies directed against defined linear epitopes on domain 4 of anthrax protective antigen. *Infect. Immun.* 2009; 77 (11): 4859–67.
18. Brossier F., Lévy M., Landier A., Lafaye P., Mock M. Functional analysis of *Bacillus anthracis* protective antigen by using neutralizing monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 2004; 72 (11): 6313–7.
19. Little S.F., Leppla S.H., Cora E. Production and characterization of monoclonal antibodies to the protective antigen component of *Bacillus anthracis* toxin. *Infect. Immun.* 1988; 56 (7): 1807–13.

20. Mohamed N., Clagett M., Li J., Jones S., Pincus S., D'alia G., Nardone L., Babin M., Spitalny G., Casey L. A high-affinity monoclonal antibody to anthrax protective antigen passively protects rabbits before and after aerosolized *Bacillus anthracis* spore challenge. *Infect. Immun.* 2005; 73 (2): 795–802.

21. Mazumdar S. Raxibacumab. *MAbs.* 2009; 1 (6): 531–8.

22. Albrecht M.T., Li H., Williamson D., LeButt C.S., Flick-Smith H.C., Quinn C.P., et al. Human monoclonal antibodies against anthrax lethal factor and protective antigen act independently to protect against *Bacillus anthracis* infection and enhance endogenous immunity to anthrax. *Infect. Immun.* 2007; 75 (11): 5425–33.

23. Peterson J.W., Comer J.E., Noffsinger D.M., Wenglikowski A., Walberg K.G., Chatuev B.M. Human monoclonal anti-protective antigen antibody completely protects rabbits and is synergistic with

ciprofloxacin in protecting mice and guinea pigs against inhalation anthrax. *Infect. Immun.* 2006; 74 (2): 1016–24.

24. Hou A.W., Morrill A.M. Obiltoximab: adding to the treatment arsenal for *Bacillus anthracis* infection. *Ann. Pharmacother.* 2017; 51 (10): 908–13.

25. Maynard J.A., Maassen C.B.M., Leppla S.H., Brasky K., Patterson J.L., Iverson B.L. Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. *Nat. Biotechnol.* 2002; 20 (6): 597–601.

26. Mabry R., Rani M., Geiger R., Hubbard G.B., Carrion R. Jr, Brasky K. Passive protection against anthrax by using a high-affinity antitoxin antibody fragment lacking an Fc region. *Infect. Immun.* 2005; 73 (12): 8362–8.

27. Greig S.L. Obiltoximab: first global approval. *Drugs.* 2016; 76 (7): 823–30.

Сведения об авторах

Романенко Яна Олеговна – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболensk, Российская Федерация
E-mail: muntian.jana@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1698-6516>

Марьин Максим Александрович – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболensk, Российская Федерация
E-mail: max_m-91@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0003-0560-915X>

Рябко Алена Константиновна – науч. сотр. лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболensk, Российская Федерация
E-mail: ryabko_alena@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7478-909X>

Карцева Алена Сергеевна – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболensk, Российская Федерация
E-mail: kartseva_as@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3159-6439>

Силкина Марина Владимировна – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболensk, Российская Федерация
E-mail: marksil@yandex.ru,
<https://orcid.org/0000-0002-5329-2807>

Зенинская Наталья Алексеевна – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболensk, Российская Федерация
E-mail: nataliazeninskaya@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5388-292X>

Шемякин Игорь Георгиевич – д-р биол. наук, проф., зам. директора по научной работе, ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболensk, Российская Федерация
E-mail: shemyakin@obolensk.org
<https://orcid.org/0000-0001-9667-1674>

Дятлов Иван Алексеевич – акад. РАН, д-р. мед. наук, проф., директор ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболensk, Российская Федерация
E-mail: dyatlov@obolensk.org
<https://orcid.org/0000-0003-1078-4585>

Фирстова Виктория Валерьевна – д-р биол. наук, гл. науч. сотр. лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболensk, Российская Федерация
E-mail: firstova@obolensk.org
<http://orcid.org/0000-0002-9898-9894>

Authors' information

Yana O. Romanenko – Junior Researcher of Laboratory of Molecular Biology SRC AMB, Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation
E-mail: muntian.jana@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1698-6516>

Maxim A. Marin – Junior Researcher of Laboratory of Molecular Biology SRC AMB, Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation
E-mail: max_m-91@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0003-0560-915X>

Alena K. Riabko – Researcher of Laboratory of Molecular Biology SRC AMB, Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation
E-mail: ryabko_alena@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7478-909X>

Alena S. Kartseva – Junior Researcher of Laboratory of Molecular Biology SRC AMB, Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation
E-mail: kartseva_as@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3159-6439>

Marina V. Silkina – Junior Researcher of Laboratory of Molecular Biology SRC AMB, Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation
E-mail: marksil@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5329-2807>

Natalya A. Zeninskaya – Junior Researcher of Laboratory of Molecular Biology SRC AMB, Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation
E-mail: nataliazeninskaya@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5388-292X>

Igor G. Shemyakin – Dr.Sci., Prof., Deputy Research Director, SRC AMB, Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation
E-mail: shemyakin@obolensk.org
<https://orcid.org/0000-0001-9667-1674>

Ivan A. Dyatlov – Acad. of RAS, MD, PhD, Prof., Director, SRC AMB, Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation
E-mail: dyatlov@obolensk.org
<https://orcid.org/0000-0003-1078-4585>

Victoria V. Firstova – Dr.Sci, Principal Researcher of the Laboratory of Molecular Biology SRC AMB, Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation
E-mail: firstova@obolensk.org
<http://orcid.org/0000-0002-9898-9894>