

Изучение антитоксических свойств моноклонального антитела к летальному фактору и его вклад в токсин-нейтрализующее действие сибиреязвенного токсина

Т.А.Иващенко, Я.О.Романенко, А.С.Карцева, М.В.Силкина, М.А.Марьин, М.М.Рогозин,
М.А.Шкуратова, А.Е.Хлынцева, Т.И.Комбарова, В.В.Фирстова

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Одним из способов нейтрализации летального токсина (ЛТ) сибирской язвы является применение специфических к нему моноклональных антител (МКА). В данном исследовании для нейтрализации ЛТ нами была предложена композиция, состоящая из МКА 1Е10, специфичного к IV домену протективного антигена (ПА), и МКА 2D8, специфичного к I домену летального фактора (ЛФ).

Цель. Изучение антитоксического действия МКА 2D8, специфичного к ЛФ, отдельно и совместно с МКА 1Е10.

Материалы и методы. Субъединицы ЛТ – полноразмерные ПА и ЛФ *B. anthracis* были получены в прокариотической системе экспрессии. Для получения необходимого количества МКА гибридомы 1Е10 и 2D8 культивировали в организме мышей до появления асцитных опухолей. МКА из асцитической жидкости выделяли посредством аффинной хроматографии на колонке с сорбентом Protein G Sepharose. Оценку токсин-нейтрализующей активности антител проводили как *in vitro*, в МТТ-тесте с использованием клеточной линии макрофагов мыши J774A.1, так и *in vivo* с использованием мышей линии BALB/c.

Результаты. В экспериментах *in vitro* было показано, что предложенная композиция МКА 1Е10 и 2D8 способна нейтрализовать действие ЛТ в количестве IC100 на 98%. В эксперименте *in vivo* МКА 2D8 обеспечивало 60% выживаемость мышей.

Заключение. МКА 2D8, специфичное к I домену ЛФ, может представлять собой дополнительный потенциальный инструмент для терапии сибиреязвенной инфекции. Поскольку IV домен ПА играет ведущую роль в связывании с рецепторами на поверхности эукариотических клеток, а I домен ЛФ необходим для проникновения ЛФ внутрь клетки, то можно предположить, что совместное применение МКА 1Е10 и 2D8 позволит блокировать как проникновение токсина внутрь клетки, так и сборку ЛТ.

Ключевые слова: летальный токсин, моноклональные антитела, протективный антиген, летальный фактор

Для цитирования: Иващенко Т.А., Романенко Я.О., Карцева А.С., Силкина М.В., Марьин М.А., Рогозин М.М., Шкуратова М.А., Хлынцева А.Е., Комбарова Т.И., Фирстова В.В. Изучение антитоксических свойств моноклонального антитела к летальному фактору и его вклад в токсин-нейтрализующее действие сибиреязвенного токсина. Бактериология. 2025; 10(1): 8–16. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-8-16

Study of antitoxic properties of monoclonal antibody to lethal factor and its contribution to toxin-neutralizing effect of anthrax toxin

T.A.Ivashchenko, Ya.O.Romanenko, A.S.Kartseva, M.V.Silkina, M.A.Marin, M.M.Rogozin,
M.A.Shkuratova, A.E.Khlyntseva, T.I.Kombarova, V.V.Firstova

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region,
Russian Federation

One of the ways in neutralizing anthrax lethal toxin is the use of monoclonal antibodies (MAb) specific to LT subunits. In this study, we proposed a composition consisting of MAb 1E10 specific to the IV domain of PA and MAb 2D8 specific to the I domain of LF.

Для корреспонденции:

Иващенко Татьяна Александровна, кандидат биологических наук,
научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии
и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск,
Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-00-46
ORCID: 0000-0002-4908-2524

Статья поступила 05.11.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Tatiana A. Ivashchenko, PhD in Biological Sciences, Researcher
of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied
Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov,
Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-00-46
ORCID: 0000-0002-4908-2524

The article was received 05.11.2024, accepted for publication 31.03.2025

Objective. Of this study was to study the antitoxic effect of LF-specific MAb 2D8 alone and together with MAb 1E10.

Materials and methods. The subunits of LT, full-length protective antigen (PA) and lethal factor (LF). *B. anthracis* were obtained in a prokaryotic expression system. To obtain the required amount of MAb, hybridomas 1E10 and 2D8 were cultured in mice until ascitic tumors appeared. MAb from ascitic fluid were isolated by affinity chromatography on a column with Protein G Sepharose sorbent. The toxin-neutralizing activity of antibodies was evaluated both in vitro and in vivo in MTT test using mouse macrophage cell line J774A.1 using BALB/c mice.

Results. In *in vitro* experiments it was shown that the proposed composition of MAb 1E10 and 2D8 was able to neutralize the effect of LT in the amount of IC₁₀₀ by 98%. In the *in vivo* experiment, MAb 2D8 provided 60% survival rate of mice.

Conclusion. Thus, MAb 2D8 specific to the I domain of LF may represent an additional potential tool for the therapy of anthrax infection. Since the IV domain of PA plays a leading role in binding to receptors on the surface of eukaryotic cells, and the I domain of LF is required for LF penetration into the cell interior, it is conceivable that co-administration of MAb 1E10 and 2D8 may block LT assembly.

Key words: lethal toxin, monoclonal antibodies, protective antigen, lethal factor

For citation: Ivashchenko T.A., Romanenko Ya.O., Kartseva A.S., Silkina M.V., Marin M.A., Rogozin M.M., Shkuratova M.A., Khlyntseva A.E., Kombarova T.I., Firstova V.V. Study of antitoxic properties of monoclonal antibody to lethal factor and its contribution to toxin-neutralizing effect of anthrax toxin. *Bacteriology*. 2025; 10(1): 8–16. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-8-16

Сибирская язва – зооантропонозное инфекционное заболевание, вызываемое бактериями *Bacillus anthracis*, представляет серьезную проблему для ветеринарии и здравоохранения во многих странах мира [1]. Основными резервуарами возбудителя сибирской язвы являются контаминированная спорами почва или зараженные животные [2]. Вспышки сибирской язвы в России регистрируются спорадически. Например, в 2016 г. почти 100 человек были госпитализированы из-за вспышки сибирской язвы среди кочевых сообществ на севере Сибири, более 2300 северных оленей погибли от сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе. Единичные случаи заболевания ежегодно регистрируются в эндемичных регионах Российской Федерации. В марте 2022 г. было выявлено два случая заражения сибирской язвой. В Республике Дагестан был зарегистрирован один случай заболевания кожной формы сибирской язвы при убойе инфицированного животного. В июне этого же года в Ставропольском крае был зарегистрирован еще один такой же случай [3]. Совсем недавно в марте 2023 г. в Республике Чувашия было зарегистрировано 3 случая заражения кожной формой, а в июне этого же года в Республике Тыва зафиксирован второй случай заболевания [4].

Основным фактором патогенности *B. anthracis* является летальный токсин (ЛТ), состоящий из протективного антигена (ПА) и летального фактора (ЛФ). Каждый из компонентов по отдельности не обладает токсическими свойствами, а только при их сборке в единую структуру [5]. ПА и ЛФ представляют собой белки, каждый из которых состоит из 4 структурных доменов, выполняющих свою функцию в сборке ЛТ. На ранних стадиях сибиреязвенной инфекции в сублетальных дозах ЛТ подавляет реакции иммунных клеток, что приводит к ускоренному размножению бактерий. На поздних стадиях заболевания накопление ЛТ в кровяном русле приводит к развитию шокового состояния с последующим летальным исходом [6].

Вакцинация ежегодно проводится в эндемичных районах для людей и животных, что является неотъемлемой частью профилактики сибирской язвы [7]. Однако для поддержания стабильного иммунитета требуется регулярная вакцинация [8]. В подтвержденных случаях для лечения сибиреязвенной инфекции используют антибиотики, но на поздних стадиях

заболевания они не эффективны и не способны выводить из кровотока накопившийся токсин, что в дальнейшем приводит к развитию шокового состояния с последующим летальным исходом [9]. Таким образом, существует потребность в препаратах, в основу которых будут входить моноклональные антитела (МКА). МКА являются классом терапевтических средств, которые могут действовать строго специфично и способны блокировать сборку ЛТ [10].

ЛТ состоит из двух субъединиц: ПА и ЛФ. ПА связывается с рецепторами на поверхности эукариотической клетки и способствует проникновению ЛТ внутрь клетки, а в дальнейшем – ЛФ в цитозоль. Проникнув в цитозоль, ЛФ гидролизует внутриклеточные субстраты клеток организма хозяина, что и обуславливает проявление цитотоксичности ЛТ. Поэтому для эффективной стратегии лечения и профилактики сибиреязвенной инфекции эффективной является нейтрализация ПА и ЛФ одновременно.

В предыдущих исследованиях методом классической гибридомной технологии было получено и охарактеризовано МКА 1E10, специфичное к IV домену ПА [11]. Было показано, что МКА 1E10 нейтрализует активность ЛТ *in vitro* и *in vivo*. Целью данного исследования являлось изучение антитоксического действия МКА 2D8, специфического к ЛФ, отдельно и совместно с МКА 1E10.

Материалы и методы

Получение и очистка рекомбинантного летального токсина

Субъединицы рекомбинантных белков ЛТ *B. anthracis* – рекомбинантный (рПА) [10] и рекомбинантный (рЛФ) [12] были получены в прокариотической системе экспрессии. Продукты рекомбинантных белков получали, трансформируя штамм *E. coli* BL21(DE3) экспрессионными плазмидами pET22b – ПА, pET22b – ЛФ. Полученные трансформанты высевали на агарозную среду на основе 2xYT, содержащую 1% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина, далее наращивали при 37°C в среде 2xYT, содержащей 0,1% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина. В течение 6 ч проводили экспрессию белка с добавлением 0,4 мМ ИПТГ при 25°C. После экспрессии клетки были собраны центрифугированием с последующим лизированием. Очистку полученного лизата проводили на

колонке с Ni-сефарозой (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.

Лабораторные животные

При проведении экспериментов были использованы мыши инбредной линии BALB/c (питомник «Пушино», ФИБХ РАН, Московская обл., г. Пушино). Масса мышей составляла 18–20 г, возраст – 6–8 нед. Мыши содержались по 5 особей в клетках типа «микроизолятор» в контролируемых условиях окружающей среды (температура воздуха 20–24°C, относительная влажность 35–40%, освещение в помещениях – искусственное, с фиксированным режимом день-ночь). В качестве подстилки использовали древесные опилки нехвойных пород, в качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ 50258-92 производства ООО «Лабораторкорм».

Получение и очистка МКА, специфичных к летальному токсину

Для получения МКА, специфичных к ЛФ сибиреязвенного токсина, мышей линии BALB/c иммунизировали по схеме: подкожно рЛФ в дозе 100 мкг/мышь с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ), через 2 нед. животных повторно иммунизировали в дозе 100 мкг/мышь с неполным адъювантом Фрейнда (НАФ), спустя 2 нед. мышей реиммунизировали в дозе 10 мкг/мышь рЛФ без адъюванта. На 3-и сутки после последней иммунизации проводили гибридизацию спленоцитов гипериммунных мышей (1×10^8 клеток) с партнером для слияния – клетками мышинной миеломной линии *Mus musculus* Sp2/0-Ag14 (1×10^7 клеток) методом электрослияния [13]. Таким образом была получена панель гибридом, из которой выбрано наиболее перспективное МКА 2D8, специфичное к ЛФ сибиреязвенного токсина.

Гибридомы, синтезирующие МКА, культивировали *in vivo*, для этого мышей линии BALB/c внутрибрюшинно обрабатывали пристаном (Sigma, США) по 0,5 мл и через 2–3 нед. интраперитонеально вводили по от 2×10^6 до 4×10^6 гибридные клетки 1E10, продуцирующие МКА, специфичные к ПА, и 2D8, продуцирующие МКА, специфичные к ЛФ. Сбор асцитической жидкости производили по мере созревания асцита на 7–15-е сутки. Выделение МКА из асцитической жидкости проводили методом 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.

Характеристика полученного МКА 2D8, специфичного к ЛФ летального токсина.

Определение доменной и классовой принадлежности

Для определения доменной специфичности МКА 2D8 проводили иммуноблот с рекомбинантным белком ЛФ и I доменом ЛФ, слитым с глутатион-S-трансферазой (GST). Белки подвергали электрофорезу в 10% ПААГ, после чего

осуществляли горизонтальный перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra (GE Healthcare, Великобритания) в блоттере (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. Далее мембрану отмывали фосфатно-солевым буфером с добавлением 0,05% твин 20 (ФСБ-Т). Потом мембрану инкубировали с МКА 2D8 в концентрации 1 мкг/мл в ФСБ в течение 1 ч при температуре 37°C. После инкубации мембраны трехкратно отмывали буфером ФСБ-Т. Далее мембрану 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 тыс., затем промывали ФСБ-Т четырехкратно. Визуализацию реакции проводили раствором субстратной смеси на основе диаминобензидина (0,05% диаминобензидина (Sigma, США), 0,015% H_2O_2 в ФСБ pH 7,4). Реакцию останавливали промывкой дистиллированной водой, далее мембраны высушивали.

Подкласс МКА 2D8 определяли в иммунохроматографическом тесте с использованием коммерческого набора для определения изотипов мышинных моноклональных антител (Roche Diagnostic Corporation, США).

Определение токсин-нейтрализующей активности МКА *in vitro*

Токсин-нейтрализующую активность МКА в отношении ЛТ определяли в МТТ-тесте (Mosmann, 1983) на клеточной линии мышинных макрофагов J774 A.1. В лунки 96-луночного планшета вносили клетки в концентрации 2×10^4 на лунку в среде ДМЕМ с добавлением 10% ФБС и инкубировали 12 ч при 37°C и 5% CO_2 . Первоначально готовили разведение рекомбинантного ЛТ в концентрации, составляющей IC100. Было определено, что конечные концентрации ЛТ, используемые в эксперименте, приводящие к гибели 100% клеток, составили 0,8 мкг/мл рПА и 0,27 мкг/мл рЛФ.

МКА 1E10 и 2D8 брали в концентрациях 5 мкг/мл и титровали двукратным шагом до 0,07 мкг/мл. А также готовили коктейль МКА 1E10 и 2D8 в концентрациях 2,5 мкг/мл и титровали двукратным шагом до 0,04 мкг/мл. Компоненты ЛТ (ПА + ЛФ) в количестве IC100 добавляли к антителам с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37°C. Далее приготовленные смеси добавляли в лунки планшета, содержащие макрофаги, и инкубировали 4 ч при 37°C и 5% CO_2 . В качестве положительного контроля использовали лунки без добавления токсина и МКА (достигая 100% жизнеспособных клеток). В качестве отрицательного контроля использовали и лунки с добавлением мертиолята натрия (Oskar Tropitzsch, Германия) в концентрации 0,024% (достигая 0% жизнеспособных клеток). По окончании инкубации во все лунки вносили по 10 мкл раствора МТТ (5 мкг/мл) в ФСБ и инкубировали еще 4 ч при тех же условиях. Затем в лунки планшета вносили по 150 мкл диметилсульфоксида для растворения образовавшихся кристаллов формазана и измеряли сигнал при длине волны 540 нм на планшетном спектрофотометре (Bio-Rad xMark, США).

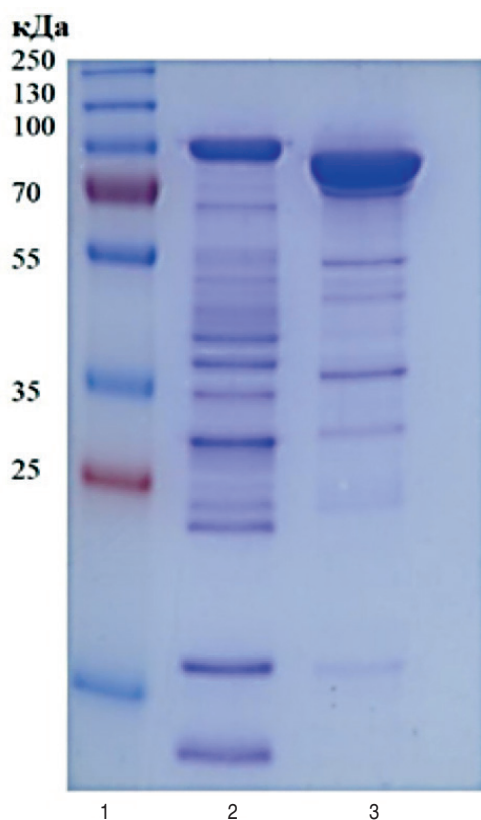


Рис. 1. Электрофореграмма рекомбинантных белков ПА и ЛФ: 1 – маркеры молекулярных масс PageRuler™ SM1811 (Fermentas, США); 2 – рекомбинантный ЛФ (90,2 кДа); 3 – рекомбинантный ПА (83 кДа).

Fig. 1. Electrophoregram of recombinant PA and LF proteins: 1 – markers PageRuler™ SM1811 molecular mass markers (Fermentas, USA); 2 – recombinant LF (90.2 kDa); 3 – recombinant PA (83 kDa).

Определение LD₅₀ летального токсина и токсин-нейтрализующей активности МКА в эксперименте *in vivo*

Токсин-нейтрализующую активность определяли на мышах линии BALB/c (по 9 мышей в группе). Первым этапом определили LD₅₀ ЛТ, для этого готовили разведения ЛТ (рПА/рЛФ = 1/1), начиная с 24 мкг/мышь до 4 мкг/мышь с двукратным разведением и вводили в ретроорбитальную вену глаза. Контрольной группе мышей вводили раствор чистого ФСБ. Учет гибели животных проводили раз в сутки. Значение LD₅₀ рассчитывали по методу Кербера.

$$LD_{50} = LD_{100} - S(Z \cdot D) / M, \text{ где}$$

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

Для определения защитной дозы МКА 2D8, специфичное к I домену ЛФ, по отдельности и в комплексе с МКА 1E10, специфичным к IV домену ПА, внутрибрюшинно вводили мышам линии BALB/c (по 9 голов в группе) 1 : 1 в разных дозах: 100 мкг/мышь, 50 мкг/мышь. Через 24 ч после введения антител мышей иммунизировали ретроорбитально в дозе 4LD₅₀ (48 мкг/мышь ЛТ, рПА/рЛФ = 1/1). Контрольная группа мышей получала инъекцию ЛТ в дозе LD₅₀ (6 мкг рПА/6 мкг ЛФ). Учет гибели животных проводили раз в сутки в течение 14 дней.

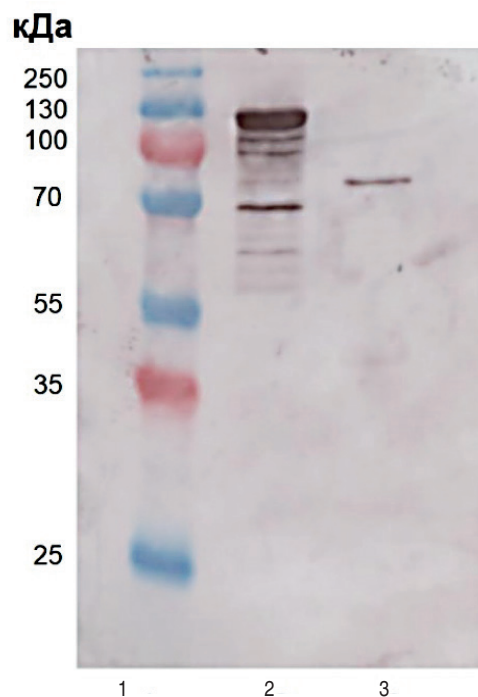


Рис. 2. Специфическая активность МКА 2D8 по отношению к рекомбинантному полноразмерному ЛФ I домену ЛФ *B. anthracis*: 1 – маркеры молекулярных масс PageRuler™ SM1811 (Fermentas, США); 2 – полноразмерный рекомбинантный ЛФ; 3 – рекомбинантный I домен ЛФ-GST.

Fig. 2. Specific activity of MCA 2D8 against the recombinant full-length LF I domain of *B. anthracis* LF: 1 – PageRuler™ SM1811 molecular weight markers (Fermentas, USA); 2 – full-length recombinant LF; 3 – recombinant I domain of LF.

Результаты исследования

Результаты получения и очистки рекомбинантного летального токсина

Субъединицы рекомбинантных белков ПА и ЛФ были получены в прокариотической системе экспрессии. Очистку проводили методом аффинной хроматографии на колонке с Ni – сефарозой (Roche, Германия) с последующей доочисткой методом гель-фильтрации, чистоту проверяли с помощью SDS-электрофореза по Лэммли в 10% ПААГ. По результатам электрофореграммы видно, что очищенные рекомбинантные белки соответствуют своему молекулярному весу (рис. 1).

Результаты определения доменной специфичности МКА 2D8 к ЛФ

Доменную специфичность МКА 2D8 доказали методом иммуноблотинга. Было показано, что исследуемое МКА специфично к рекомбинантному I домену ЛФ (рис. 2).

Результаты хроматографической очистки МКА, специфичных к летальному токсину

Очистку МКА 1E10 и 2D8 проводили из асцитической жидкости методом аффинной хроматографии на колонке с сорбентом Protein G Sepharose (GE Healthcare, Великобритания) с последующей доочисткой методом гель-фильтрации, чистоту проверяли с помощью SDS-электрофореза по Лэммли в 10% ПААГ в денатурирующих и

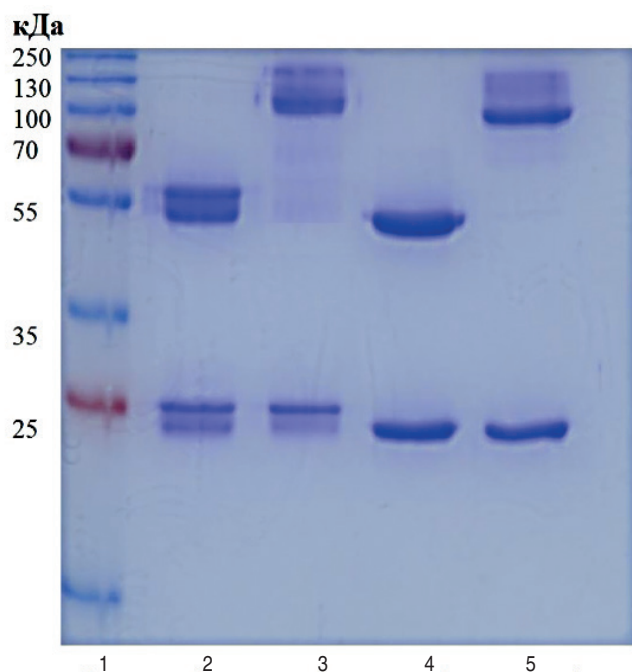


Рис. 3. Электрофореграмма МКА 1Е10, специфичного к ПА, и 2D8, специфичного к ЛФ: 1 – маркеры молекулярных масс PageRuler™ SM1811 (Fermentas, США); 2 – образец МКА 1Е10 в денатурирующих условиях; 3 – образец МКА 1Е10 в неденатурирующих условиях; 4 – образец МКА 2D8 в денатурирующих условиях; 5 – образец МКА 2D8 в неденатурирующих условиях.
Fig. 3. Electrophoregram of MCA 1E10 specific to PA and 2D8 specific to LF: 1 – PageRuler™ SM1811 molecular weight markers (Fermentas, USA); 2 – MCA 1E10 sample under denaturing conditions; 3 – MCA 1E10 sample under non-denaturing conditions; 4 – MCA sample 2D8 under denaturing conditions 5 – MCA 2D8 sample under non-denaturing conditions.

неденатурирующих условиях. По результатам электрофореграммы видно, что очищенные МКА 1Е10 и 2D8 соответствуют своему молекулярному весу. Степень чистоты по данным денситометрии (GE Typhoon FLA 9500, Швеция) составила не менее 95% (рис. 3).

Результаты определения классовой принадлежности МКА 2D8, специфичного к ЛФ

Результаты иммунохроматографического теста показали, что исследуемое МКА 2D8 относится к классу иммуноглобулинов G, изотипу G1 и имеет карпа цепь (рис. 4).

Результаты определения токсин-нейтрализующей активности МКА в отношении ЛТ *B. anthracis* в эксперименте *in vitro*

Токсин-нейтрализующая активность исследуемых МКА: 2D8, специфичного к I домену ЛФ, и 1Е10, специфичного к IV домену ПА, была определена в МТТ-тесте на клеточной линии макрофагов J 774 A.1. По результатам проведенного теста было показано, что МКА 2D8 в максимальной концентрации 5 мкг/мл нейтрализовало действие ЛТ (0,8 мкг/мл рПА и 0,27 мкг/мл рЛФ) в дозе IC100. Токсин-нейтрализующая активность составила 91%. В минимальной концентрации МКА 2D8 0,075 мкг/мл токсин-нейтрализующая активность составила 40%. МКА 1Е10 в максимальной концентрации 1,25 мкг/мл и выше нейтрализовало действие ЛТ в дозе IC100 на 93%, а в минимальной концентрации 0,075 мкг/мл

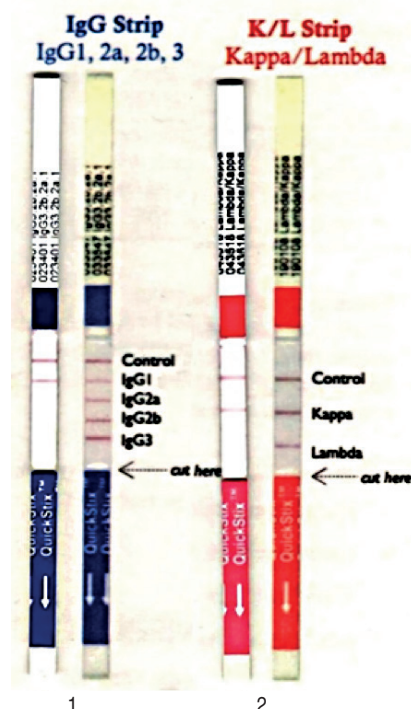


Рис. 4. Классовая принадлежность МКА 2D8: 1 – тест-полоска на определение класса цепей иммуноглобулина; 2 – тест-полоска на определение Кappa/Lambda цепей иммуноглобулина.
Fig. 4. Class affiliation of MCA 2D8: 1 – test strip for immunoglobulin chain class determination; 2 – immunoglobulin Kappa/Lambda chain detection test strip.

токсин-нейтрализующая активность составила 27%. Нейтрализующая активность комплексного использования МКА 2D8 и 1Е10 в концентрации 0,6 мкг/мл и выше составила 98%. В минимальной концентрации 0,075 мкг/мл нейтрализация ЛТ 35% (рис. 5).

Результаты определения токсин-нейтрализующей активности МКА в отношении ЛТ *B. anthracis* в эксперименте *in vivo*

Далее мы исследовали способность МКА 2D8 нейтрализовать действие ЛТ в экспериментах *in vivo* на мышинной модели. В нашем предыдущем исследовании были изучены протективные свойства МКА 1Е10 [11]. Было установлено, что введение МКА 1Е10 мышам линии BALB/c в количестве

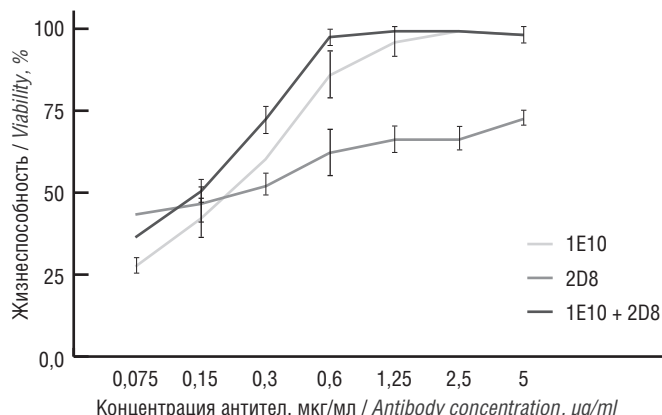


Рис. 5. Определение токсин-нейтрализующей активности МКА 1Е10 и 2D8 на клеточной линии мышиных макрофагов J774A.1
Fig. 5. Determination of toxin-neutralizing activity of MCA 1E10 and 2D8 on mouse macrophage cell line J774A.1.

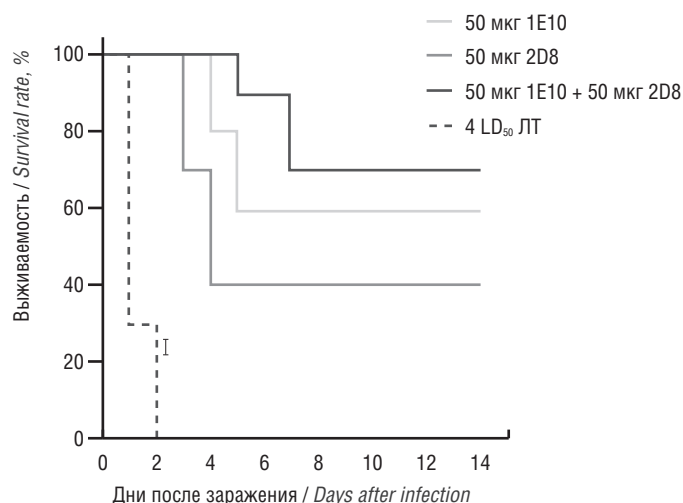


Рис. 6. Оценка протективных свойств МКА (50 мкг/мышь) после внутривенного введения ЛТ в дозе 4 LD₅₀.

Fig. 6. Evaluation of the protective properties of MCA (50 µg/mouse) after intravenous administration of LT at a dose of 4 LD₅₀.

50 мкг обеспечивает 70% выживаемость животных; при введении 100 мкг наблюдалась 100% защита. В данной работе мы изучили протективные свойства МКА 2D8, а также попытались выяснить, будет ли комбинация МКА 2D8 и МКА 1E10, направленных к разным мишеням ЛТ, нейтрализовать ЛТ более эффективно, чем каждое антитело в отдельности. Мышам внутрибрюшинно вводили МКА 2D8 как по отдельности, так и в комбинации с МКА 1E10. Спустя 24 ч внутривенно вводили ЛТ в дозе 4LD₅₀. Результаты исследований показали, что введение по отдельности МКА 2D8 и 1E10 в количестве 50 мкг/мышь обеспечивало 40% и 60% выживаемость мышей соответственно. Совместное введение двух исследуемых МКА приводило к 70% выживаемости животных (рис. 6).

Результаты исследований показали, что введение МКА 2D8 в дозе 100 мкг/мышь обеспечивает защиту в 60% случаев. Введение комбинации МКА 2D8 и 1E10 в эквивалентной дозе обеспечивает 100% выживаемость мышей (рис. 7). Таким образом, можно сделать вывод, что протективный эффект при введении комбинации исследуемых антител в данной концентрации обусловлен преимущественно действием МКА 1E10.

Обсуждение

Основным фактором патогенности бактерии *B. anthracis* является ЛТ [14]. Сибиреязвенный экзотоксин состоит из ПА с молекулярной массой 83 кДа и ЛФ с молекулярной массой 90,2 кДа [15]. Сборка ЛТ – довольно сложный и многоэтапный процесс. На первом этапе ПА с помощью IV домена связывается с рецепторами на поверхности эукариотических клеток, и сразу после этого полноразмерный ПА начинает расщепляться фурин-подобными протеазами клетки-хозяина с образованием ПА (63 кДа) [16]. Далее мономерный ПА (63 кДа) с участием III домена олигомеризуется, образуя гептамерные или октамерные структуры, называемые препорами [17]. Через образовавшуюся препору ЛФ с участием I домена проходит внутрь клетки с образованием эн-

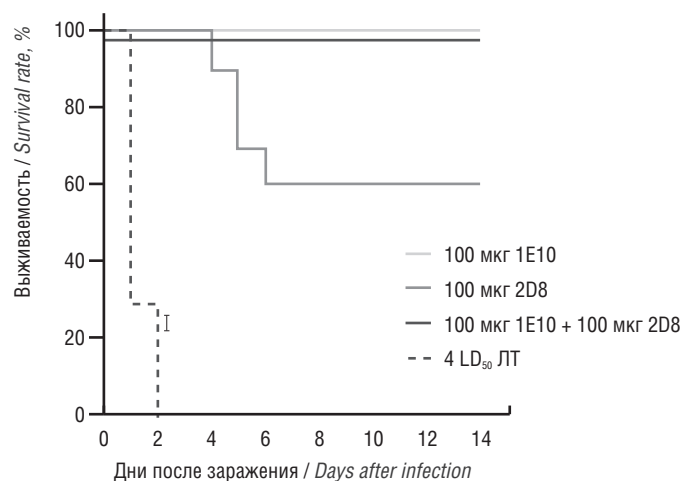


Рис. 7. Оценка протективных свойств МКА (100 мкг/мышь) после внутривенного введения ЛТ в дозе 4 LD₅₀.

Fig. 7. Evaluation of the protective properties of MCA (100 µg/mouse) after intravenous administration of LT at a dose of 4 LD₅₀.

досомы, в которой происходит сборка ЛТ [18]. Далее содержимое эндосомы постепенно закисляется, что способствует превращению препоры в истинную пору. Таким образом, токсическое действие ЛТ осуществляется только при выходе в цитозоль клетки через истинную пору. В цитозоле клетки ЛТ инактивирует митоген-активирующие белковые киназы, что приводит к гибели клетки-мишени [19].

В данной работе было охарактеризовано мышинное МКА 2D8, обладающее специфической активностью к I домену ЛФ, относящееся к классу иммуноглобулинов G, изотипу G1 и имеющее легкую цепь kappa. В экспериментах *in vitro* методом МТТ-теста с использованием клеточной линии J774 A.1 была определена его токсин-нейтрализующая активность в отношении ЛТ *B. anthracis*. Результаты МТТ-теста показали, что МКА 2D8 в концентрации 5 мкг/мл нейтрализует действие ЛТ в дозе IC₁₀₀ на 70%.

Ранее нами было получено МКА 1E10, специфичное к IV домену ПА и характеризующееся способностью нейтрализовать ЛТ в *in vitro* и *in vivo* экспериментах [11]. В данном исследовании было установлено, что МКА 2D8, специфичное к I домену ЛФ, также обладает способностью нейтрализовать ЛТ.

Несмотря на то что одного МКА, нейтрализующего действие ЛТ *B. anthracis*, может быть достаточно для обеспечения защиты, предпочтительней использовать смесь более чем одного МКА против разных компонентов токсина. Например, H.C.Staats et al. установили, что МКА 9A11, специфичное к ЛФ, обеспечивало эффективную защиту *in vivo* при введении всего лишь 0,375 мг/мышь, в то время как МКА 3F11, специфичное к ПА, не защищало в дозе 1,5 мг/мышь [23].

Кроме этого, ПА может мутировать в известных нейтрализующих эпитопах, что приводит к неэффективности терапии МКА [20]. Также антитела против ПА могут стать неэффективными в случае проникновения большого количества токсина в клетки. В связи с этим разработка антител, нацеленных на другие компоненты ЛТ, является актуальным направлением [21].

Поскольку полученные нами антитела – МКА 2D8 к 1E10 направлены к разным мишеням сибиреязвенного токсина и характеризуются высоким нейтрализующим потенциалом, мы изучили их нейтрализующую активность в отношении ЛТ в комбинации друг с другом в *in vitro* и *in vivo* экспериментах.

Результаты наших исследований на макрофагах показали, что минимальная концентрация МКА 1E10 и 2D8, необходимая для нейтрализации 98% ЛТ, составила 0,3 мкг/мл для каждого антитела. В исследовании N.Mohamed et al. было получено МКА 14B7, специфичное к ПА, которое в экспериментах *in vitro* нейтрализовало ЛТ в дозе IC100 при концентрации 3 мкг/мл [22]. Таким образом, для нейтрализации ЛТ требуется концентрация полученных нами антител на порядок ниже в сравнении с МКА 14B7 в вышеописанном исследовании.

Далее на мышинной модели мы провели оценку токсин-нейтрализующей активности двух МКА по отдельности, а также в комбинации друг с другом с целью выявления способности комбинации двух антител против ПА и ЛФ усиливать нейтрализующую активность в отношении ЛТ.

Добавление МКА 2D8 к 1E10 продемонстрировало усиление нейтрализующей активности в отношении ЛТ в тестах *in vitro*. Эксперименты на мышах показали, что совместное введение МКА 1E10 и 2D8 в количестве 50 мкг/мышь приводило к синергетическому эффекту нейтрализации ЛТ. Выживаемость животных увеличивалась на 10% по сравнению с выживаемостью мышей при введении МКА 1E10 отдельно. Несмотря на незначительный синергичный эффект, использование двух антител для профилактики и терапии сибиреязвенной токсикоинфекции может быть необходимым, если учитывать возможность проникновения мутантного варианта ПА, который не будет взаимодействовать с МКА 1E10.

Увеличение концентрации МКА, вводимого в организм, до 100 мкг/мышь затруднило проведение оценки их синергичного эффекта на нейтрализацию ЛТ в связи со 100% выживаемостью мышей при введении одного МКА 1E10.

Вероятно, на способность комбинации антител обеспечивать аддитивную/синергетическую защитную активность могли повлиять многие факторы, включая плотность экспрессии антигена, специфичность эпитопа, связывающую аффинность МКА и изотип антитела.

Таким образом, МКА 2D8, нейтрализующее проявление ферментативной активности ЛФ, может быть использовано совместно с МКА 1E10 в качестве потенциального терапевтического препарата с расширенным спектром нейтрализующей активности.

Заключение

В данной работе экспериментально обоснована возможность использования комбинации МКА 1E10 и 2D8 в качестве потенциального терапевтического препарата, дополняющего лечение антибиотиками для купирования токсин-зависимых симптомов сибирской язвы. Для снижения реактогенности препарата мышинные МКА 1E10 и 2D8 планируется химеризовать и гуманизировать.

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке отраслевой научной программы Роспотребнадзора.

Funding source

The work was supported by the Sectoral Scientific Program of the Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература

1. Carlson CJ, Kracalik IT, Ross N, Alexander KA, Hugh-Jones ME, Fegan M, et al. The global distribution of *Bacillus anthracis* and associated anthrax risk to humans, livestock and wildlife. *Nat Microbiol*. 2019 Aug;4(8):1337-1343. DOI: 10.1038/s41564-019-0435-4
2. Шишкова НА, Тюрин ЕА, Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Мокриевич АН. Современное состояние проблемы сибирской язвы. *Бактериология*. 2017;2(3):33-40. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-3-33-40
3. Рязанова АГ, Скударева ОН, Герасименко ДК, Логвин ФВ, Аксенова ЛЮ, Семенова ОВ, и др. Анализ ситуации по сибирской язве в 2022 г. в мире, прогноз на 2023 г. в Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(2):88-94. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-88-94
4. Информация о состоянии здоровья заразившихся сибирской язвой – БУ «Республиканская клиническая офтальмологическая больница» Минздрава Чувашии [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://rkob.med.cap.ru/press/2023/3/22/informaciya-o-sostoyanii-zdorovjya-zarazivshihsyayscld=m73b3gzhp89605491> (дата обращения: 10.09.2024).
5. Zhou B, Carney C, Janda KD. Selection and characterization of human antibodies neutralizing *Bacillus anthracis* toxin. *Bioorg Med Chem*. 2008 Feb 15;16(4):1903-13. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.11.001
6. Moayeri M, Leppla SH. The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2004 Feb;7(1):19-24. DOI: 10.1016/j.mib.2003.12.001
7. Mazumdar S. Raxibacumab. *MAbs*. 2009 Nov-Dec;1(6):531-8. DOI: 10.4161/mabs.1.6.10195
8. Chen Z, Moayeri M, Purcell R. Monoclonal antibody therapies against anthrax. *Toxins (Basel)*. 2011 Aug;3(8):1004-19. DOI: 10.3390/toxins3081004
9. Castelli MS, McGonigle P, Hornby PJ. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacol Res Perspect*. 2019 Dec;7(6):e00535. DOI: 10.1002/prp2.535
10. Белова ЕВ, Колесников АВ, Захарова МЮ, Дубилей СА, Дятлов ИА, Шемякин ИГ. Особенности иммунного ответа на летальный токсин *Bacillus anthracis*. *Биоорганическая химия*. 2008;34(5):639-644.
11. Романенко ЯО, Марьин МА, Рябко АК, Карцева АС, Силкина МВ, Зенинская НА, и др. Токсин-нейтрализующая активность моноклональных антител против летального токсина *Bacillus anthracis*. *Иммунология*. 2021;42(3):232-242. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-3-232-242
12. Zakharova MY, Kuznetsov NA, Dubiley SA, Kozyr AV, Fedorova OS, Chudakov DM, et al. Substrate recognition of anthrax lethal factor examined by combinatorial and pre-steady-state kinetic approaches. *J Biol Chem*. 2009 Jul 3;284(27):17902-13. DOI: 10.1074/jbc.M807510200
13. Силкина МВ, Карцева АС, Рябко АК, Марьин МА, Романенко ЯО, Калмантаева ОВ, и др. Оптимизация условий электрослияния для получения гибридом, синтезирующих человеческие моноклональные антитела. *Биотехнология*. 2021;37(2):77-87.
14. Brachman PS. Inhalation anthrax. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;353:83-93. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1980.tb18910.x
15. Young JA, Collier RJ. Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:243-65. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142728

16. Lacy DB, Wigelsworth DJ, Melnyk RA, Harrison SC, Collier RJ. Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 7;101(36):13147-51. DOI: 10.1073/pnas.0405405101
17. Kintzer AF, Thoren KL, Sterling HJ, Dong KC, Feld GK, Tang II, et al. The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes. *J Mol Biol*. 2009 Sep 25;392(3):614-29. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.07.037
18. Chen Z, Moayeri M, Crown D, Emerson S, Gorshkova I, Schuck P, et al. Novel chimpanzee/human monoclonal antibodies that neutralize anthrax lethal factor, and evidence for possible synergy with anti-protective antigen antibody. *Infect Immun*. 2009 Sep;77(9):3902-8. DOI: 10.1128/IAI.00200-09
19. Wickner W, Schekman R. Protein translocation across biological membranes. *Science*. 2005 Dec 2;310(5753):1452-6. DOI: 10.1126/science.1113752
20. Yamamoto BJ, Shadiack AM, Carpenter S, Sanford D, Henning LN, O'Connor E, et al. Efficacy Projection of Obiltoximab for Treatment of Inhalational Anthrax across a Range of Disease Severity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Sep 23;60(10):5787-95. DOI: 10.1128/AAC.00972-16
21. Zhang D, Liu W, Wen Z, Li B, Liu S, Li J, et al. Establishment of a New Zealand White Rabbit Model for Lethal Toxin (LT) Challenge and Efficacy of Monoclonal Antibody 5E11 in the LT-Challenged Rabbit Model. *Toxins (Basel)*. 2018 Jul 12;10(7):289. DOI: 10.3390/toxins10070289
22. Mohamed N, Li J, Ferreira CS, Little SF, Friedlander AM, Spitalny GL, et al. Enhancement of anthrax lethal toxin cytotoxicity: a subset of monoclonal antibodies against protective antigen increases lethal toxin-mediated killing of murine macrophages. *Infect Immun*. 2004 Jun;72(6):3276-83. DOI: 10.1128/IAI.72.6.3276-3283.2004
23. Staats HF, Alam SM, Searce RM, Kirwan SM, Zhang JX, Gwinn WM, et al. In vitro and *in vivo* characterization of anthrax anti-protective antigen and anti-lethal factor monoclonal antibodies after passive transfer in a mouse lethal toxin challenge model to define correlates of immunity. *Infect Immun*. 2007 Nov;75(11):5443-52. DOI: 10.1128/IAI.00529-07
9. Castelli MS, McGonigle P, Hornby PJ. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacol Res Perspect*. 2019 Dec;7(6):e00535. DOI: 10.1002/prp2.535
10. Belova EV, Kolesnikov AV, Zakharova MYu. Dubiley SA, Dyatlov IA, Shemyakin IG. Special Features of Immune Response to the Lethal Toxin of *Bacillus anthracis*. *Bioorganic Chemistry*. 2008; 34(5):639-644. (In Russian).
11. Romanenko YaO, Marin MA, Riabko AK, Kartseva AS, Silkina MV, Zeninskaya NA, et al. Toxin neutralizing activity of monoclonal antibodies against *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Immunologiya*. 2021;42(3):232-42. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-3-232-242 (In Russian).
12. Zakharova MY, Kuznetsov NA, Dubiley SA, Kozyr AV, Fedorova OS, Chudakov DM, et al. Substrate recognition of anthrax lethal factor examined by combinatorial and pre-steady-state kinetic approaches. *J Biol Chem*. 2009 Jul 3;284(27):17902-13. DOI: 10.1074/jbc.M807510200
13. Silkina MV, Kartseva AS, Ryabko AK, Marin MA, Romanenko YaO, Kalmantaeva OV, et al. Optimization of electrofusion conditions for obtaining hybridomas synthesizing human monoclonal antibodies. *Biotechnologiya*. 2021;37(2):77-87. (In Russian).
14. Brachman PS. Inhalation anthrax. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;353:83-93. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1980.tb18910.x
15. Young JA, Collier RJ. Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:243-65. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142728
16. Lacy DB, Wigelsworth DJ, Melnyk RA, Harrison SC, Collier RJ. Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 7;101(36):13147-51. DOI: 10.1073/pnas.0405405101
17. Kintzer AF, Thoren KL, Sterling HJ, Dong KC, Feld GK, Tang II, et al. The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes. *J Mol Biol*. 2009 Sep 25;392(3):614-29. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.07.037
18. Chen Z, Moayeri M, Crown D, Emerson S, Gorshkova I, Schuck P, et al. Novel chimpanzee/human monoclonal antibodies that neutralize anthrax lethal factor, and evidence for possible synergy with anti-protective antigen antibody. *Infect Immun*. 2009 Sep;77(9):3902-8. DOI: 10.1128/IAI.00200-09
19. Wickner W, Schekman R. Protein translocation across biological membranes. *Science*. 2005 Dec 2;310(5753):1452-6. DOI: 10.1126/science.1113752
20. Yamamoto BJ, Shadiack AM, Carpenter S, Sanford D, Henning LN, O'Connor E, et al. Efficacy Projection of Obiltoximab for Treatment of Inhalational Anthrax across a Range of Disease Severity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Sep 23;60(10):5787-95. DOI: 10.1128/AAC.00972-16
21. Zhang D, Liu W, Wen Z, Li B, Liu S, Li J, et al. Establishment of a New Zealand White Rabbit Model for Lethal Toxin (LT) Challenge and Efficacy of Monoclonal Antibody 5E11 in the LT-Challenged Rabbit Model. *Toxins (Basel)*. 2018 Jul 12;10(7):289. DOI: 10.3390/toxins10070289
22. Mohamed N, Li J, Ferreira CS, Little SF, Friedlander AM, Spitalny GL, et al. Enhancement of anthrax lethal toxin cytotoxicity: a subset of monoclonal antibodies against protective antigen increases lethal toxin-mediated killing of murine macrophages. *Infect Immun*. 2004 Jun;72(6):3276-83. DOI: 10.1128/IAI.72.6.3276-3283.2004
23. Staats HF, Alam SM, Searce RM, Kirwan SM, Zhang JX, Gwinn WM, et al. In vitro and *in vivo* characterization of anthrax anti-protective antigen and anti-lethal factor monoclonal antibodies after passive transfer in a mouse lethal toxin challenge model to define correlates of immunity. *Infect Immun*. 2007 Nov;75(11):5443-52. DOI: 10.1128/IAI.00529-07

References

1. Carlson CJ, Kralick IT, Ross N, Alexander KA, Hugh-Jones ME, Fegan M, et al. The global distribution of *Bacillus anthracis* and associated anthrax risk to humans, livestock and wildlife. *Nat Microbiol*. 2019 Aug;4(8):1337-1343. DOI: 10.1038/s41564-019-0435-4
2. Shishkova NA, Tyurin EA, Marinin LI, Dyatlov IA, Mokrievich AN. Current state of the anthrax problem. *Bacteriology*. 2017;2(23):33-40. DOI:10.20953/2500-1027-2017-3-33-40 (In Russian).
3. Ryazanova AG, Skudareva ON, Gerasimenko DK, Logvin FV, Aksenova LY, Semenova OV, et al. Analysis of the Situation on Anthrax in the World in 2022, the Forecast for the Russian Federation for 2023. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;2(2):88-94. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-88-94 (In Russian).
4. Information on the health status of those infected with anthrax – State Budgetary Institution “Republican Clinical Ophthalmological Hospital” of the Ministry of Health of Chuvashia [Electronic resource]. Available at: <https://rkob.med.cap.ru/press/2023/3/22/informaciya-o-sostoyanii-zdorov'ya-zarazivshisya?ysclid=m73b3gzhpk89605491> (accessed 10.09.2024).
5. Zhou B, Carney C, Janda KD. Selection and characterization of human antibodies neutralizing *Bacillus anthracis* toxin. *Bioorg Med Chem*. 2008 Feb 15;16(4):1903-13. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.11.001
6. Moayeri M, Leppa SH. The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2004 Feb;7(1):19-24. DOI: 10.1016/j.mib.2003.12.001
7. Mazumdar S. Raxibacumab. *MAbs*. 2009 Nov-Dec;1(6):531-8. DOI: 10.4161/mabs.1.6.10195
8. Chen Z, Moayeri M, Purcell R. Monoclonal antibody therapies against anthrax. *Toxins (Basel)*. 2011 Aug;3(8):1004-19. DOI: 10.3390/toxins3081004
9. Castelli MS, McGonigle P, Hornby PJ. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacol Res Perspect*. 2019 Dec;7(6):e00535. DOI: 10.1002/prp2.535
10. Belova EV, Kolesnikov AV, Zakharova MYu. Dubiley SA, Dyatlov IA, Shemyakin IG. Special Features of Immune Response to the Lethal Toxin of *Bacillus anthracis*. *Bioorganic Chemistry*. 2008; 34(5):639-644. (In Russian).
11. Romanenko YaO, Marin MA, Riabko AK, Kartseva AS, Silkina MV, Zeninskaya NA, et al. Toxin neutralizing activity of monoclonal antibodies against *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Immunologiya*. 2021;42(3):232-42. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-3-232-242 (In Russian).
12. Zakharova MY, Kuznetsov NA, Dubiley SA, Kozyr AV, Fedorova OS, Chudakov DM, et al. Substrate recognition of anthrax lethal factor examined by combinatorial and pre-steady-state kinetic approaches. *J Biol Chem*. 2009 Jul 3;284(27):17902-13. DOI: 10.1074/jbc.M807510200
13. Silkina MV, Kartseva AS, Ryabko AK, Marin MA, Romanenko YaO, Kalmantaeva OV, et al. Optimization of electrofusion conditions for obtaining hybridomas synthesizing human monoclonal antibodies. *Biotechnologiya*. 2021;37(2):77-87. (In Russian).
14. Brachman PS. Inhalation anthrax. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;353:83-93. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1980.tb18910.x
15. Young JA, Collier RJ. Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:243-65. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142728
16. Lacy DB, Wigelsworth DJ, Melnyk RA, Harrison SC, Collier RJ. Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 7;101(36):13147-51. DOI: 10.1073/pnas.0405405101
17. Kintzer AF, Thoren KL, Sterling HJ, Dong KC, Feld GK, Tang II, et al. The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes. *J Mol Biol*. 2009 Sep 25;392(3):614-29. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.07.037
18. Chen Z, Moayeri M, Crown D, Emerson S, Gorshkova I, Schuck P, et al. Novel chimpanzee/human monoclonal antibodies that neutralize anthrax lethal factor, and evidence for possible synergy with anti-protective antigen antibody. *Infect Immun*. 2009 Sep;77(9):3902-8. DOI: 10.1128/IAI.00200-09
19. Wickner W, Schekman R. Protein translocation across biological membranes. *Science*. 2005 Dec 2;310(5753):1452-6. DOI: 10.1126/science.1113752
20. Yamamoto BJ, Shadiack AM, Carpenter S, Sanford D, Henning LN, O'Connor E, et al. Efficacy Projection of Obiltoximab for Treatment of Inhalational Anthrax across a Range of Disease Severity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Sep 23;60(10):5787-95. DOI: 10.1128/AAC.00972-16
21. Zhang D, Liu W, Wen Z, Li B, Liu S, Li J, et al. Establishment of a New Zealand White Rabbit Model for Lethal Toxin (LT) Challenge and Efficacy of Monoclonal Antibody 5E11 in the LT-Challenged Rabbit Model. *Toxins (Basel)*. 2018 Jul 12;10(7):289. DOI: 10.3390/toxins10070289
22. Mohamed N, Li J, Ferreira CS, Little SF, Friedlander AM, Spitalny GL, et al. Enhancement of anthrax lethal toxin cytotoxicity: a subset of monoclonal antibodies against protective antigen increases lethal toxin-mediated killing of murine macrophages. *Infect Immun*. 2004 Jun;72(6):3276-83. DOI: 10.1128/IAI.72.6.3276-3283.2004
23. Staats HF, Alam SM, Searce RM, Kirwan SM, Zhang JX, Gwinn WM, et al. In vitro and *in vivo* characterization of anthrax anti-protective antigen and anti-lethal factor monoclonal antibodies after passive transfer in a mouse lethal toxin challenge model to define correlates of immunity. *Infect Immun*. 2007 Nov;75(11):5443-52. DOI: 10.1128/IAI.00529-07

Информация о соавторах:

Романенко Яна Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-1698-6516

Карцева Алена Сергеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-3159-6439

Силкина Марина Владимировна, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-5329-2807

Марьин Максим Александрович, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-0560-915X

Рогозин Метхун Мадисович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-3361-3263

Шкуратова Мария Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-8021-8453

Хлынцева Анна Евгеньевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-0052-2602

Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-1959-1739

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-9898-9894

Information about co-authors:

Yana O. Romanenko, Junior Researcher of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-1698-6516

Alena S. Kartseva, PhD in Biological Sciences, Researcher of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-3159-6439

Marina V. Silkina, Researcher of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-5329-2807

Maxim A. Marin, Researcher of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-0560-915X

Metkhun M. Rogozin, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-3361-3263

Maria A. Shkuratova, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-8021-8453

Anna E. Khylyntseva, PhD in Biological Sciences, Researcher Junior Researcher of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-0052-2602

Tatiana I. Kombarova, PhD in Biological Sciences, Senior Research Associate, Laboratory of Biological Testing, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-1959-1739

Victoria V. Firstova, PhD, DSc in Biological Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-9898-9894

НОВОСТИ НАУКИ

Открытие фермента дает новую надежду на стратегии лечения болезни Лайма

Зоонозный патоген, возбудитель болезни Лайма *Borrelia burgdorferi* выработала уникальные метаболические пути, некоторые из которых являются специфическими и необходимыми для ее выживания и, таким образом, представляют собой идеальные цели для разработки новых терапевтических средств. *B. burgdorferi* обходится без тиамина в качестве кофактора и полагается на лактатдегидрогеназу (BbLDH) для преобразования пирувата в лактат для балансировки соотношений NADH/NAD⁺. Было показано, что BbLDH является канонической лактатдегидрогеназой с некоторыми уникальными биохимическими и структурными особенностями. Исследование потери функции показывает, что BbLDH необходим для выживания и инфекционности *B. burgdorferi*, подчеркивая его терапевтический потенциал. Скрининг лекарственных средств выявляет четыре ранее неизвестных ингибитора лактатдегидрогеназы с минимальной цитотоксичностью, два из которых подавляют рост *B. burgdorferi*. Это исследование дает механистическое представление о функции BbLDH в патофизиологии *B. burgdorferi* и закладывает основу для разработки специфичных для данного рода метаболических ингибиторов против *B. burgdorferi* и, возможно, других патогенов, переносимых клещами.



Sze CW, Lynch MJ, Zhang K, Neau DB, Ealick SE, Crane BR, et al.
Lactate dehydrogenase is the Achilles' heel of Lyme disease bacterium Borrelia burgdorferi.
mBio. 2025 Mar 20:e0372824. DOI: 10.1128/mbio.03728-24