

Получение и характеристика моноклональных антител к шигатоксину 2-го типа

М.А.Шкуратова, О.В.Калмантаева, Н.А.Зенинская, А.Е.Хлынцева, Н.Н.Карцев, Т.И.Комбарова,
Е.С.Перескокова, А.А.Ершова, М.А.Марьин, О.В.Коробова, А.И.Борзилов, Э.А.Светоч, В.В.Фирстова

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

Шигатоксин-продуцирующие штаммы *Escherichia coli* (STEC) являются основными возбудителями геморрагического колита, который может привести к опасным для жизни осложнениям, включая гемолитико-уремический синдром. Введение в организм пациента моноклональных антител (МКА), специфичных к шигатоксину (Stx), считается перспективным подходом для профилактики или лечения STEC-инфекций. В связи с этим разработана МКА, нейтрализующих Stx, является актуальной задачей. Нами были получены три мышиных МКА (16D4, 5G4 и 5G8) и два крысиных МКА (R3 и R8), специфических к А-субъединице шигатоксина 2-го типа (Stx2). Моноклональные антитела 16D4, R3 и R8 обладают токсиннейтрализующей активностью в тестах с Vero и в тестах на животных. Введение МКА 16D4 совместно с фильтратом культуральной жидкости, содержащей нативный Stx2, в количестве 2, 4 и 8 среднелетальных доз (LD₅₀) способствовало снижению летальных исходов среди экспериментальных животных или увеличению показателя средней суточной гибели мышей. МКА 16D4 могут рассматриваться в качестве кандидатного препарата для терапии STEC-инфекций.

Ключевые слова: шигатоксины, Stx2, моноклональные антитела, специфичность, нейтрализация токсина

Для цитирования: Шкуратова М.А., Калмантаева О.В., Зенинская Н.А., Хлынцева А.Е., Карцев Н.Н., Комбарова Т.И., Перескокова Е.С., Ершова А.А., Марьин М.А., Коробова О.В., Борзилов А.И., Светоч Э.А., Фирстова В.В. Получение и характеристика моноклональных антител к шигатоксину 2-го типа. Бактериология. 2025; 10(2): 8–14. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-8-14

Production and characterization of monoclonal antibodies to shiga toxin type 2

M.A.Shkuratova, O.V.Kalmantaeva, N.A.Zeninskaya, A.E.Khlyntseva, N.N.Kartsev, T.I.Kombarova,
E.S.Pereskokova, A.A.Ershova, M.A.Maryin, O.V.Korobova, A.I.Borzilov, E.A.Svetoch, V.V.Firstova

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

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are the main causative agents of hemorrhagic colitis, which can lead to life-threatening complications, including hemolytic uremic syndrome. Injection of monoclonal antibodies (mAbs) specific to Shiga toxin (Stx) to patients is considered a promising approach for the prevention or treatment of STEC infections. In this regard, the development of Stx-neutralizing mAbs is an urgent task. We obtained three murine mAbs (16D4, 5G4, and 5G8) and two rat mAbs (R3 and R8) specific for the A-subunit of Shiga toxin type 2 (Stx2). Monoclonal antibodies 16D4, R3, and R8 exhibited toxin-neutralizing activity in Vero and animal assays. Injection of mAb 16D4 together with culture fermentation broth containing native Stx2 in the amount of 2, 4 and 8 median lethal doses (LD₅₀) contributed to a decrease in lethal outcomes among experimental animals or an increase in the average daily mortality rate of mice. MAb 16D4 can be considered as a candidate drug for the therapy of STEC infections.

Key words: shiga toxins, Stx2, monoclonal antibodies, specificity, toxin neutralization

For citation: Shkuratova M.A., Kalmantaeva O.V., Zeninskaya N.A., Khlyntseva A.E., Kartsev N.N., Kombarova T.I., Pereskokova E.S., Ershova A.A., Maryin M.A., Korobova O.V., Borzilov A.I., Svetoch E.A., Firstova V.V. Production and characterization of monoclonal antibodies to shiga toxin type 2. Bacteriology. 2025; 10(2): 8–14. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-8-14

Для корреспонденции

Шкуратова Мария Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
E-mail: shkuratova@obolensk.org
Телефон: (4967) 36-0003
ORCID: 0000-0001-8021-8453

Статья поступила 01.05.2025, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Maria A. Shkuratova, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
E-mail: shkuratova@obolensk.org
Телефон: (4967) 36-0003
ORCID: 0000-0001-8021-8453

The article was received 01.05.2025, accepted for publication 30.06.2025

Шигатоксины (Stx) – семейство белков, продуцируемых бактериями рода *Shigella* (преимущественно *Shigella dysenteriae* серотипа 1) и некоторыми штаммами *Escherichia coli*, так называемыми шигатоксин-продуцирующими штаммами *E. coli* (Shiga toxin-producing *E. coli*/STEC). Штаммы STEC продуцируют шигатоксин 1-го типа (Stx1) и/или шигатоксин 2-го типа (Stx2). Белки Stx1 и Stx2 являются основным фактором патогенности данных бактерий. Эшерихиозы, вызванные штаммами STEC, в ряде случаев приводят к развитию геморрагического колита, гемолитико-уремического синдрома (ГУС) и неврологических осложнений. Наиболее тяжелые проявления заболевания наблюдаются у маленьких детей и пожилых людей [1].

Представители семейства шигатоксинов имеют сходную молекулярную структуру и состоят из одной А-субъединицы (~32–33 кДа, Stx2A), выполняющей ферментативную функцию, и пентамерного кольца (~38,5 кДа), которое включает 5 В-субъединиц (~7,7 кДа каждая, Stx2B), отвечающих за связывание с рецептором и проникновение токсина внутрь клетки. Основную роль в проявлении цитотоксичности выполняет А1-фрагмент субъединицы А, который инактивирует рибосомы и запускает каскад реакций, приводящих к апоптозу клетки [2].

В настоящее время не существует специфической профилактики развития ГУС или терапии интоксикации Stx. Лечение носит исключительно поддерживающий характер и включает регидратационную терапию и, при необходимости, диализ. Нейтрализация Stx до появления тяжелых симптомов выступает как один из перспективных подходов предотвращения развития ГУС. В таком случае эффективным методом профилактики заболевания для детей с риском возникновения ГУС является использование токсиннейтрализующих препаратов, например антител [3]. Ингибирование цитотоксичности шигатоксина обеспечивается путем либо блокирования связывания Stx-белков с клетками, либо вмешательства в любой из последующих этапов внутриклеточной транспортировки токсина к рибосоме [4].

Разработан ряд моноклональных антител (МКА), способных с разной степенью эффективности ингибировать Stx2. Только два МКА – urtoxazumab (TMA-15) и Shigamabs® (αStx1 и αStx2) – были протестированы U.S. Food and Drug Administration на людях и прошли 1-й этап клинических испытаний еще в 2010 и 2013 г. соответственно [5]. Поиск и разработка МКА, способных эффективно нейтрализовать шигатоксин, продолжаются, о чем свидетельствует ежегодное появление новых исследований [6].

Цель работы – получить моноклональные антитела, специфичные к Stx2, и провести анализ их нейтрализующей активности.

Материалы и методы

Шигатоксины

В работе использовали: рекомбинантные А- и В-субъединицы Stx2 (rStx2A, rStx2B), полученные в лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ [7], и фильтраты культуральной жидкости (КЖ), содержащей нативный Stx2, штамма *E. coli* серотипа O181:H4 (инв. № В-9427 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов

ФБУН ГНЦ ПМБ «ГКПМ-Оболensk») [8, 9] и нативные Stx1 и Stx2 штамма *E. coli* O157:H7 ATCC 51658 (инв. № 6842). В исследовании в качестве контроля также использовались фильтраты КЖ, не содержащей Stx2, штамма *E. coli* ATCC 25922 (инв. № В-2393).

Получение мышинных и крысиных моноклональных антител

Мышей линии BALB/c (самки, 16–18 г) иммунизировали белками rStx2A и rStx2B в количестве 50 мкг/мышь. Молодых самок крыс линии Wistar (6–8 нед.) иммунизировали rStx2A с расчетом 150 мкг белка на одно животное. Животные были получены из филиала «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА (Андреевка, Россия). Проверку титра специфичности антител у иммунизированных животных проводили непрямой твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА). Связывание иммуноглобулинов (Ig) G с антигеном детектировали при помощи вторичных антител: кроличьих антител против целой молекулы мышинного IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена в рабочем разведении (Anti-Mouse IgG (whole molecule) Peroxidase antibody produced in rabbit; Sigma, США) или козьих антител против целой молекулы крысиного IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена (Anti-Rat IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in goat, Sigma, США) соответственно.

Гибридизацию спленоцитов иммунных мышей проводили по стандартному протоколу [10]. В качестве партнера для слияния использовали мышиную миеломную клеточную линию X63-Ag8.653.

Спленоциты иммунных крыс сливали с клетками-партнерами мышинной миеломной линии Sp2/0-Ag14 (ATCC, США) в соотношении 2:1. Гибридизацию производили методом электрослияния на приборе BTX ECM2001 (Harvard Apparatus, США) по методике, описанной в статье [11].

Клетки полученных гибридом культивировали в среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 20% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, GE Healthcare, США) и раствор гипоксантина-аминоптерина-тимидина (Gibco, Thermo Fisher, США).

Иммунотипирование МКА для выявления подтипов иммуноглобулинов проводили с использованием наборов полосок IsoQuick (ISOQ5 и ISOQ25) согласно протоколу, описанному в руководстве.

Выделение и очистка антител

Для получения крысиных МКА (R3, R8) гибридные клетки наращивали в 1 л ростовой среды, мышиное МКА (16D4) – в асцитах. Очистку проводили методом аффинной хроматографии на колонке с сорбентом Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Великобритания). Выделенные иммуноглобулины переводили в 0,1М фосфатно-солевой буфер, pH 7,4 («Эко-Сервис», Россия). Чистоту полученных иммуноглобулиновых фракций оценивали по результатам электрофореза в 10%-м полиакриламидном геле (ПААГ) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях по методу Лэммли с окраской геля кумасси R-250. После отмывки сканировали гель в аппарате Amersham Imager 680 (GE Healthcare, Швеция). Эффективность хроматографической очистки МКА анализировали с помощью программного обеспечения Bandscan5.0.

Анализ специфической активности МКА в иммуноферментном анализе

Для проверки специфической активности очищенных МКА проводили непрямой вариант ИФА. Для этого в тестовые лунки 96-луночных полистироловых планшетов, сенсibilизированных рекомбинантными Stx2A или Stx2B в концентрации 10 мкг/мл, вносили последовательные двукратные разведения МКА, начиная с 1 мкг/лунку в объеме 100 мкл. Вторичные антитела, указанные ранее, использовали в разведении 1:5000 и добавляли в объеме 100 мкл/лунку соответственно первичным антителам.

Реакцию проявляли с помощью готового субстрат-индикаторного раствора ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, Amresco, США). Учет результатов проводили на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм.

Специфичность МКА в иммуноблоттинге

Специфичность к субъединицам шигатоксинов и взаимодействие с фильтратом КЖ, содержащей нативный Stx2, штамма *E. coli* O181:H4, определяли методом иммунного блоттинга. Для этого антигены, а именно rStx2A и rStx2B (по 1 мкг/лунку), а также фильтрат КЖ, не содержащий Stx2, штамма *E. coli* ATCC 25922 (отрицательный контроль) разделяли по молекулярной массе, используя метод вертикального электрофореза в 12%-м ПААГ для rStx2A и в 15%-м ПААГ в буфере с трицином для rStx2B. Белки из геля переносили на нитроцеллюлозные мембраны с помощью полусухой ячейки TransBlot SD SemiDry (Bio-Rad, США) по стандартному протоколу.

Свободные участки мембраны блокировали в 1%-м молоке. После отмывки мембраны инкубировали с МКА 16D4, 5G4, 5G8, R3 и R8 в разведении 1:250. После инкубирования мембраны трижды промывали фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,05% твин-20 (ФСБ-Т), для удаления несвязавшихся антител. Вторичные антитела использовали те же, что указаны выше, также в разведении 1:5000. Инкубирование продолжалось 40 мин при комнатной температуре. После этого мембраны отмывали раствором ФСБ-Т не менее 6 раз. Для визуализации реакции в качестве субстрата использовали 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид (Sigma, США).

Анализ специфической активности МКА к нативному шигатоксину с использованием иммунохемилюминесцентного анализа

Анализ специфической активности МКА к нативным шигатоксинам проводили с использованием фильтрата КЖ, содержащей нативный Stx2, штамма *E. coli* O181:H4. Для этого проводили электрофорез проб фильтрата КЖ, содержащей нативный шигатоксин (15 мкл/лунку) в 15%-м ПААГ. В качестве положительного контроля использовали раствор рекомбинантного белка (0,1 мкг на лунку), отрицательного – фильтрат КЖ, не содержащий Stx2, штамма *E. coli* ATCC 25922. Далее повторяли методику проведения иммуноблоттинга, описанную выше. Для обнаружения белка использовали хемилюминесцентный субстрат SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, США). Детекцию проводили по стандартному протоколу. Для визуализации изображения использовали прибор Amersham Imager 680 (GE Healthcare Life Sciences, США).

Определение токсиннейтрализующей активности МКА против шигатоксина *in vitro*

Определение средней цитотоксической дозы (CD₅₀) для фильтрата КЖ, содержащего нативный Stx2, штамма *E. coli* O181:H4 проводили по методике, которую использовали для исследования рекомбинантного белка [7]. Фильтраты КЖ, содержащие и не содержащие нативный Stx2, добавляли в лунки при их последовательных двукратных разведениях от 1/10 до 1/320.

Исследования токсиннейтрализующей активности МКА оценивали в МТТ-тесте. Для этого готовили культуральные планшеты с клеточной линией Vero в концентрации 2·10⁴ клеток/лунку. Затем инкубировали фильтраты КЖ, содержащей нативный Stx2, в дозе 2 CD₅₀ со следующими МКА: 16D4; R3; R8; TMA-15; 5G8 и 5G4, в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе. Все МКА добавляли в концентрации 10 и 20 мкг/мл. После инкубации смесь фильтрат КЖ-МКА вносили по 100 мкл в лунки с клетками Vero. В качестве контролей использовали лунки без добавления КЖ, содержащей Stx2 (достигая 100% жизнеспособных клеток, контроль сравнения K1); лунки с добавлением мертиолята натрия (Oskar Tropitzsch, Германия) до конечной концентрации 0,024% (достигая 100% нежизнеспособных клеток, контроль сравнения K2). Далее культуральные планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе 72 ч. Через 72 ч инкубации в лунки добавляли по 10 мкл стокового раствора МТТ (до конечной концентрации 50 мкг/мл) и инкубировали еще 4 ч. Затем аккуратно отбирали культуральную среду с МТТ и лизировали клеточный слой добавлением 100 мкл диметилсульфоксида (Sigma-Aldrich, США). Планшеты помещали на платформу шейкера TS-100C (BioSan, Латвия) и качали 30 мин 500 об./мин при комнатной температуре. Оптическую плотность клеточного лизата измеряли при длине волны 540 нм (ОП₅₄₀) на планшетном спектрофотометре xMark. Процент выживших клеток определяли по формуле:

$$\frac{\text{ОП}_{\text{ср.опытных лунок}}}{\text{ОП}_{\text{ср. контрольных лунок (K1-K2)}}} \times 100\%, \quad (1)$$

где

ОП_{ср. опытных лунок} – это средняя (для 6 повторностей) оптическая плотность лунок с исследуемыми образцами;

ОП_{ср. контрольных лунок} – разница оптической плотности контрольных лунок:

K1 – контроль сравнения, 100% жизнеспособных клеток;

K2 – контроль сравнения, 100% нежизнеспособных клеток.

Определение токсиннейтрализующей активности МКА против шигатоксина *in vivo*

Фильтрат КЖ клинического штамма *E. coli* O157:H7 ATCC 51658 использовали для внутрибрюшинного введения мышам. Белым аутбредным мышам (самцы/самки, 20–26 г) внутрибрюшинно вводили фильтрат КЖ, содержащий нативные Stx1 и Stx2, в количестве 2, 4 и 8 среднелетальных доз (LD₅₀), предварительно инкубированных совместно с МКА (200 мкг/мышь) в течение 30 мин при 37°C. В качестве контроля использовали соответствующие смеси без добавления антител. Уровень выживаемости определяли на 7-й день.

Результаты исследования

Характеристика моноклональных антител

С использованием гибридной технологии было получено три мышиных МКА (16D4, 5G4 и 5G8) и два крысиных МКА (R3 и R8) к Stx2A. Электрофоретический профиль очищенных с помощью аффинной хроматографии МКА отражал характерное наличие тяжелой (HC) и легкой (LC) цепей с молекулярной массой 50 и 25 кДа соответственно (рис. 1).

Чистота МКА после одностадийной очистки составила: для крысиных антител – 87,5%, для мышиных – 95–98%.

Результаты иммунотипирования показали, что все исследуемые антитела относятся к классу IgG, подклассу 1, легкая цепь у всех антител соответствовала изотипу κ (каппа).

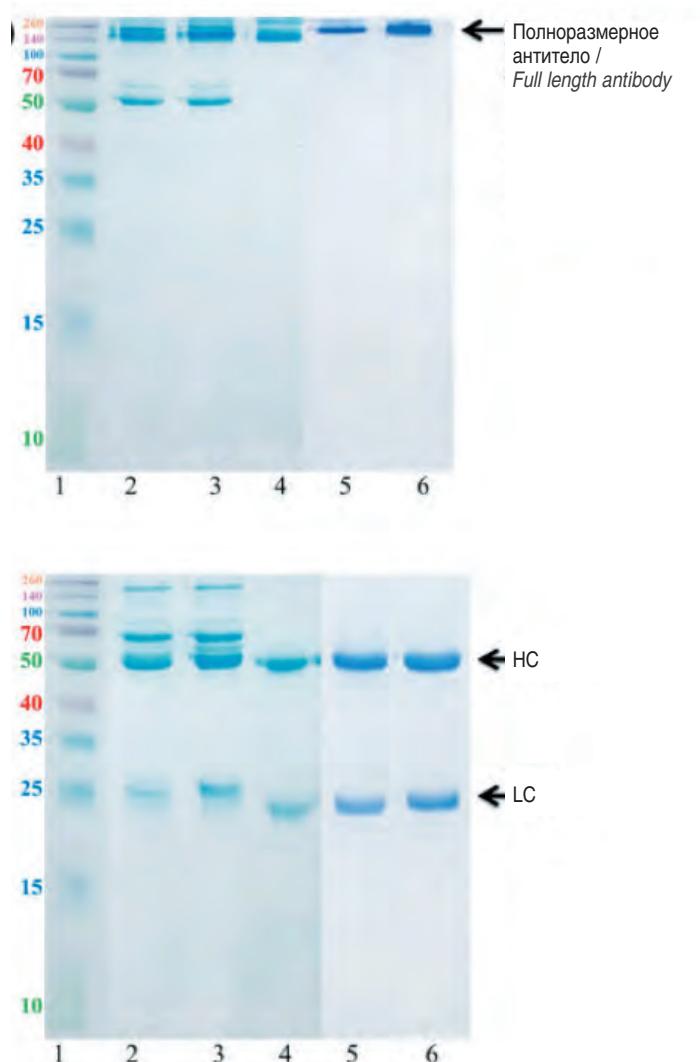


Рис. 1. Результаты электрофореза МКА после хроматографической очистки. Электрофорез МКА в 10%-м ПААГ: А) невосстанавливающие условия; Б) восстанавливающие условия. Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса белка Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; 2 – крысиное МКА R3; 3 – крысиное МКА R8; 4 – мышиное МКА 16D4; 5 – мышиное МКА 5G4; 6 – мышиное МКА 5G8.

Fig. 1. Results of electrophoresis of monoclonal antibodies after chromatographic purification. Electrophoresis of mAbs in 10% polyacrylamide gel: А) non-reducing conditions; Б) reducing conditions. Lanes: 1 – Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder molecular weight marker; 2 – rat mAb R3; 3 – rat mAb R8; 4 – mouse mAb 16D4; 5 – mouse mAb 5G4; 6 – mouse mAb 5G8.

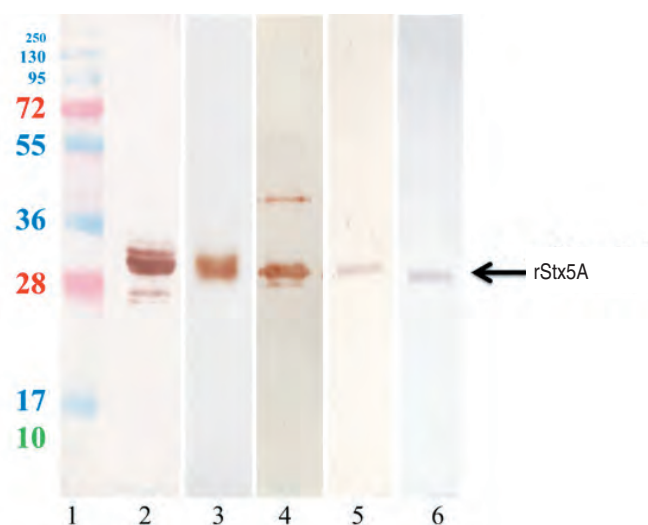


Рис. 2. Анализ специфичности МКА к рекомбинантному Stx2A. Электрофорез рекомбинантных Stx2A (2 мкг/лунку) в 12%-м ПААГ в восстанавливающих условиях по методу Лэммли с последующим иммуноблоттингом. Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса белка PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – МКА R3; 3 – МКА R8; 4 – МКА 16D4; 5 – МКА 5G4; 6 – МКА 5G8.

Fig. 2. Analysis of the mAbs specificity to recombinant Stx2A. Electrophoresis of recombinant Stx2A (2 µg/well) in 12% polyacrylamide gel under reducing conditions according to the Laemmli method followed by immunoblotting. Lanes: 1 – Molecular weight marker of the protein PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – mAb R3; 3 – mAb R8; 4 – mAb 16D4; 5 – mAb 5G4; 6 – mAb 5G8.

Специфичность МКА

В ИФА МКА 5G4, 5G8, R3, R8 и 16D4 взаимодействовали с rStx2A и не взаимодействовали с rStx2B. Специфичность МКА к rStx2A была подтверждена с помощью иммуноблоттинга (рис. 2).

Методом иммунохемилюминесцентного анализа было обнаружено, что все исследуемые МКА взаимодействуют с белками фильтрата КЖ, содержащего нативный Stx2, и с rStx2A, но не взаимодействуют с rStx2B и ни с одним белком в отрицательном контроле. Полученные в результате визуализации сигнала изображения представлены на рис. 3.

Согласно рис. 3, МКА взаимодействовали с двумя белками на уровне 28 и 33 кДа в фильтратах КЖ, содержащих нативный Stx2. Проявление двух полос с молекулярной массой 28 и 33 кДа может быть результатом частичного разделения А-субъединицы (33 кДа) нативного Stx2 на два фрагмента с молекулярной массой: А1 – 28 кДа и А2 – 5 кДа, что наблюдается при воздействии клеточных ферментов – сериновых протеаз, накапливающихся в аппарате Гольджи. Фрагмент А2 не обнаруживается при визуализации сигнала, что может быть связано с низкой разрешающей способностью геля или отсутствием специфичности МКА к данному пептиду.

Токсиннейтрализующая активность МКА в тесте in vitro

Для определения токсиннейтрализующей активности в качестве активного шига токсина использовали фильтрат КЖ, содержащий нативный Stx2, в концентрации 2 CD₅₀. МКА добавляли в концентрации 10 и 20 мкг/мл. Результаты оценки токсиннейтрализующей активности МКА представлены в табл. 1.

Таблица 1. Нейтрализующая активность МКА в отношении Stx2 *in vitro*
Table 1. Neutralizing activity of mAbs against Stx2 *in vitro*

Добавление МКА / Adding mAbs		% живых клеток в присутствии Stx2 и МКА / % of living cells in the presence of Stx2 and mAbs					
		2 CD50 без МКА / 2 CD50 without mAbs	R3	R8	16D4	5G8	5G4
Концентрация / Concentration	10 мкг/мл / 10 µg/ml	0%	27%	35%	35%	29%	21%
	20 мкг/мл / 20 µg/ml	0%	51%	54%	53%	37%	31%

Обсуждение

Несмотря на более чем 40 лет исследований, на сегодняшний день отсутствуют одобренные препараты для специфического лечения STEC-инфекций, а применение антибиотиков считается неэффективным, так как в ряде случаев может ухудшить течение заболевания за счет увеличения образования и высвобождения бактериями токсинов [10]. Системное введение МКА, специфичных к Stx-белкам, считается перспективным подходом для профилактики или лечения вызванных действием шигатоксинов заболеваний, в первую очередь ГУС. В связи с этим разработка МКА, нейтрализующих шигатоксин, является актуальной задачей [3]. Мы провели исследование по получению МКА, способных нейтрализовать Stx2, который продуцируется ответственными за развитие ГУС штаммами STEC.

Нами были получены три мышиных МКА (16D4, 5G4 и 5G8) и два крысиных МКА (R3 и R8), специфических к А-субъединице шигатоксина 2-го типа. Мышиная модель получения МКА была выбрана как классическая и наиболее отработанная. Выбор крысиной модели для получения антител к rStx2A обусловлен более выраженной иммунологической реактивностью иммунной системы крыс на простые белковые антигены, а также большей стабильностью полученных гибридом [12].

Первичный скрининг гибридом проводили с использованием rStx2A и rStx2B. В результате было выявлено, что все полученные МКА взаимодействовали с rStx2A. Все анализи-

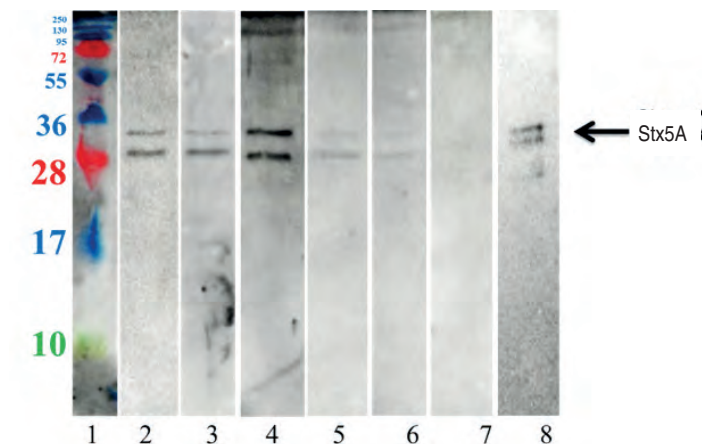


Рис. 3. Анализ специфичности МКА к нативному Stx2.

Взаимодействие МКА с белками фильтратов КЖ, содержащих нативный шигатоксин 2-го типа штамма *E. coli* O181:H4, иммунохемилюминесцентный анализ. Электрофорез в 15%-м ПААГ, в буфере с трицином. Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса белка PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – МКА R3; 3 – МКА R8; 4 – МКА 16D4; 5 – МКА 5G4; 6 – МКА 5G8; 7 – отрицательный контроль (КЖ *E. coli* O157:H7, не содержащая токсин); 8 – взаимодействие МКА R3 с рекомбинантной А-субъединицей Stx (0,1 мкг/лунку).

Fig. 3. Analysis of the specificity of mAbs to native Stx2.

Interaction of monoclonal antibodies with proteins of filtrates of culture fermentation broth containing native Shiga toxin type 2 of *E. coli* O181:H4, immunochemiluminescent assay. Electrophoresis in 15% PAGE, in buffer with tricine. Lanes: 1 – Molecular weight marker of protein PageRuler Prestained Plus Protein Ladder; 2 – mAb R3; 3 – mAb R8; 4 – mAb 16D4; 5 – mAb 5G4; 6 – mAb 5G8; 7 – negative control (culture fermentation broth of *E. coli* O157:H7, not containing toxin); 8 – interaction of mAb R3 with recombinant A-subunit Stx (0.1 µg/well).

МКА 16D4; R3 и R8 в концентрации 20 мкг/мл нейтрализовали цитотоксическое действие Stx2 в отношении клеток линии Vero, защищая >50% клеток от гибели.

Токсиннейтрализующая активность МКА на мышиной модели

На основании результатов токсиннейтрализующей активности МКА в тесте *in vitro* для дальнейших исследований были отобраны 3 МКА: мышиное 16D4 и крысиные R3 и R8. Для выявления токсиннейтрализующей активности мышам вводили фильтрат КЖ, содержащий нативные Stx1 и Stx2, в количестве 2, 4 и 8 LD₅₀ совместно с МКА. Результаты выживаемости животных представлены в табл. 2.

МКА 16D4 защищало от гибели 83% мышей при введении им 2 LD₅₀ фильтрата КЖ, содержащей Stx2, 33% животных – при введении 4 LD₅₀, но не защищало от гибели при введении 8 LD₅₀. Введение МКА R3 и R8 совместно с 2, 4 или 8 LD₅₀ фильтрата КЖ, содержащей Stx2, не защищало полностью от гибели мышей. Однако во всех летальных случаях средние сроки гибели экспериментальных животных увеличивались.

Таблица 2. Оценка токсиннейтрализующей эффективности МКА на мышиной модели
Table 2. Evaluation of the toxin-neutralizing efficacy of mAbs in a mouse model

МКА / mAb	LD ₅₀	Выживаемость (выжило/пало) / Survivability (alive/dead)	Средние сроки гибели, сутки / Average time to death, days
16D4	2	5/1	5,0
	4	2/4	4,3
	8	0/6	4,0
R3	2	1/5	4,2
	4	0/6	4,0
	8	0/6	3,7
R8	2	1/5	3,6
	4	0/6	3,5
	8	0/6	3,3
Контроли / Controls	1	3/3	4,3
	2	0/6	4,0
	4	0/6	3,8
	8	0/6	3,2

руемые МКА относились к классу IgG, подклассу 1, легкая цепь у всех антител соответствовала изотипу κ.

Перед проведением анализа токсиннейтрализующей способности МКА важно было подтвердить специфичность полученных МКА к нативному шигатоксину 2-го типа подтипа Stx2a, синтезируемому клиническим изолятом *E. coli*. В связи с низким содержанием шигатоксинов в фильтрате культуральной жидкости для детекции Stx2 использовали высокочувствительный метод хемилюминесценции. Все полученные МКА взаимодействовали с нативным шигатоксином.

На первом этапе анализ токсиннейтрализующей активности антител проводили общепринятым тестом *in vitro* с использованием клеточной линии Vero. Было выявлено, что МКА 16D4, R3 и R8 нейтрализовали цитотоксическое действие Stx2 при внесении их в клеточную культуру Vero в концентрации 20 мкг/мл.

Дальнейшее подтверждение токсиннейтрализующей активности МКА проводили на мышинной модели. Результаты экспериментов показали, что только МКА 16D4 нейтрализовало токсическое действие фильтрата культуральной жидкости, содержащей Stx2. Введение МКА 16D4 совместно с 2, 4 или 8 LD₅₀ фильтрата культуральной жидкости, содержащей шигатоксин, способствовало снижению летальных исходов среди экспериментальных животных или увеличению средних сроков гибели мышей. При проведении экспериментов, связанных с выявлением токсиннейтрализующей активности МКА, в качестве источника Stx2 использовали не очищенный токсин, а фильтрат культуральной жидкости, который содержал другие токсичные компоненты, включая ЛПС и Stx1. Эти дополнительные компоненты также приводят к развитию патологий.

Таким образом, для получения наиболее полного представления о терапевтическом потенциале МКА необходимы дополнительные исследования.

Информация о финансировании

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение №075-15-2025-525 от 30.05.2025).

Financial support

The work was carried out with the financial support of a grant from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No 075-15-2025-525 dated May 30, 2025).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Эмирова ХМ, Толстова ЕМ, Коган МЮ, Орлова ОМ, Абасеева ТЮ, Панкратенко ТЕ, и др. Гемолитико-уремический синдром, ассоциированный с шигатоксин-продуцирующей *Escherichia coli*. Нефрология. 2016;20(2):18-32.
2. Menge C. Molecular Biology of *Escherichia Coli* Shiga Toxins' Effects on Mammalian Cells. Toxins (Basel). 2020 May 23;12(5):345. DOI: 10.3390/toxins12050345

3. Tzipori S, Sheoran A, Akiyoshi D, Donohue-Rolfe A, Trachtman H. Antibody therapy in the management of shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. Clin Microbiol Rev. 2004 Oct; 17(4):926-41, table of contents. DOI: 10.1128/CMR.17.4.926-941.2004
4. Melton-Celsa AR, O'Brien AD. New Therapeutic Developments against Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. Microbiol Spectr. 2014 Oct;2(5). DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0013-2013
5. Henrique IM, Sacerdoti F, Ferreira RL, Henrique C, Amaral MM, Piazza RMF, et al. Therapeutic Antibodies Against Shiga Toxins: Trends and Perspectives. Front Cell Infect Microbiol. 2022 Feb 10; 12:825856. DOI: 10.3389/fcimb.2022.825856
6. Kirkland ME, Patfield S, Hughes AC, Hernlem B, He X. A novel Shiga toxin 2a neutralizing antibody therapeutic with low immunogenicity and high efficacy. Antimicrob Agents Chemother. 2024 Jan 10;68(1):e0059823. DOI: 10.1128/aac.00598-23
7. Шкуратова МА, Марьян МА, Погосин ММ, Калмантаева ОВ, Хлынцева АЕ, Сурин АК, и др. Оптимизация условий экспрессии рекомбинантных субъединиц шигатоксина 2-го типа *Escherichia coli* при использовании различных алгоритмов получения целевого белка. Бактериология. 2024;9(3):8-19. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-8-19
8. Kislichkina AA, Kartsev NN, Skryabin YP, Sizova AA, Kanashenko ME, Teymurazov MG, et al. Genomic Analysis of a Hybrid Enteroaggregative Hemorrhagic *Escherichia coli* O181:H4 Strain Causing Colitis with Hemolytic-Uremic Syndrome. Antibiotics (Basel). 2022 Oct 14;11(10):1416. DOI: 10.3390/antibiotics11101416
9. Kartsev NN, Detusheva EV, Kalmantaeva OV, Korobova OV, Gerasimov VN, Kombarova TI, et al. Hetero-Pathogenic O181:H4 EAHEC Strain of Sequence Type ST678 Associated with Hemolytic-Uremic Syndrome in Schoolchildren in Russia. Microorganisms. 2023 Jul 7;11(7):1771. DOI: 10.3390/microorganisms11071771
10. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-7. DOI: 10.1038/256495a0
11. Зенинская НА, Рябоко АК, Марьян МА, Комбарова ТИ, Мицевич ИП, Ерусланов БВ, и др. Получение и характеристика крысиных моноклональных антител против антигена PAL *Legionella* spp. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2022;40(2):14-20. DOI: 10.17116/molgen20224002114
12. Campbell A. Monoclonal Antibody and Immunosensor Technology – The Production and Application of Rodent and Human Monoclonal Antibodies. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier; 1991. DOI: 10.1016/s0075-7535(08)70055-x

References

1. Emirova HM, Tolstova EM, Kagan MYu, Orlova OM, Abaseeva TYu, Pankratenko TE, et al. Hemolytic uremic syndrome associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Nephrology. 2016;20(2):18-32. (In Russian).
2. Menge C. Molecular Biology of *Escherichia Coli* Shiga Toxins' Effects on Mammalian Cells. Toxins (Basel). 2020 May 23;12(5):345. DOI: 10.3390/toxins12050345
3. Tzipori S, Sheoran A, Akiyoshi D, Donohue-Rolfe A, Trachtman H. Antibody therapy in the management of shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. Clin Microbiol Rev. 2004 Oct; 17(4):926-41, table of contents. DOI: 10.1128/CMR.17.4.926-941.2004
4. Melton-Celsa AR, O'Brien AD. New Therapeutic Developments against Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. Microbiol Spectr. 2014 Oct;2(5). DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0013-2013
5. Henrique IM, Sacerdoti F, Ferreira RL, Henrique C, Amaral MM, Piazza RMF, et al. Therapeutic Antibodies Against Shiga Toxins: Trends and Perspectives. Front Cell Infect Microbiol. 2022 Feb 10; 12:825856. DOI: 10.3389/fcimb.2022.825856
6. Kirkland ME, Patfield S, Hughes AC, Hernlem B, He X. A novel Shiga toxin 2a neutralizing antibody therapeutic with low immunogenicity and high efficacy.

- Antimicrob Agents Chemother. 2024 Jan 10;68(1):e0059823. DOI: 10.1128/aac.00598-23
7. Shkuratova MA, Maryin MA, Rogozin MM, Kalmantaeva OV, Khlyntseva AE, Surin AK, et al. Optimization of the expression conditions of recombinant shiga toxin type 2 subunits from *Escherichia coli* using various algorithms for producing the target protein. Bacteriology. 2024;9(3):8-19. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-8-19 (In Russian).
8. Kislichkina AA, Kartsev NN, Skryabin YP, Sizova AA, Kanashenko ME, Teymurazov MG, et al. Genomic Analysis of a Hybrid Enterohemorrhagic Hemorrhagic *Escherichia coli* O181:H4 Strain Causing Colitis with Hemolytic-Uremic Syndrome. Antibiotics (Basel). 2022 Oct 14;11(10):1416. DOI: 10.3390/antibiotics11101416
9. Kartsev NN, Detusheva EV, Kalmantaeva OV, Korobova OV, Gerasimov VN, Kombarova TI, et al. Hetero-Pathogenic O181:H4 EAHEC Strain of Sequence Type ST678 Associated with Hemolytic-Uremic Syndrome in Schoolchildren in Russia. Microorganisms. 2023 Jul 7;11(7):1771. DOI: 10.3390/microorganisms11071771
10. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-7. DOI: 10.1038/256495a0
11. Zeninskaya NA, Riabko AK, Marin MA, Kombarova TI, Mitsevich IP, Yeruslanov BV, et al. Obtaining and characterization of rat monoclonal antibodies against the antigen PAL *Legionella* spp. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2022;40(2):14-20. DOI: 10.17116/molgen20224002114 (In Russian).
12. Campbell A. Monoclonal Antibody and Immunosensor Technology – The Production and Application of Rodent and Human Monoclonal Antibodies. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier; 1991. DOI: 10.1016/s0075-7535(08)70055-x

Информация о соавторах:

Калмантаева Ольга Валериевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Зенинская Наталья Алексеевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Хлынцева Анна Евгеньевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Карцев Николай Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Перескокова Евгения Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Ершова Анастасия Алексеевна, стажер-исследователь лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Марьин Максим Александрович, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Коробова Ольга Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Борзилов Александр Иосифович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Светоч Эдуард Арсениевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Olga V. Kalmantaeva, PhD in Biological Sciences, Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Natalia A. Zeninskaya, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Anna E. Khlyntseva, PhD in Biological Sciences, Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Nikolay N. Kartsev, PhD, MD, Senior Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Tatyana I. Kombarova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, of biological testing laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Evgenia S. Pereskokova, Junior Researcher of biological testing laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Anastasia A. Ershova, Research Intern of the laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Maksim A. Maryin, Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Olga V. Korobova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of biological testing laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Alexander I. Borzilov, PhD, MD, Researcher of biological testing laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Eduard A. Svetoch, PhD, DSc (Veterinary Sciences), Professor, Chief Researcher of the Department of Molecular Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Victoria V. Firstova, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора