



ПРОФИЛЬ *N*-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ ПРОТЕКТИВНОГО ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА ch14D5a ПРОТИВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА¹

© 2017 г. И. К. Байков*, #, А. Л. Матвеев*, И. Г. Кондратов**, Н. В. Тикунова*

*ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8

**ФГБУН Лимнологический институт СО РАН,
664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3

Поступила в редакцию 15.06.2016 г.

Принята к печати 01.08.2016 г.

Изучен профиль гликозилирования химерного антитела ch14D5a против вируса клещевого энцефалита. Установлено, что антитело ch14D5a полностью *N*-гликозилировано по остатку аспарагина-297 обеих тяжелых цепей, а основные гликоформы предположительно соответствуют гликоформам G0F, G1F и G2F, наиболее типичным для иммуноглобулинов IgG человека и для антител, секретлируемых клетками китайского хомячка СНО.

Ключевые слова: иммуноглобулины, гликозилирование, клещевой энцефалит, масс-спектрометрия.

DOI: 10.7868/S013234231701002X

ВВЕДЕНИЕ

Природные иммуноглобулины всех классов являются гликопротеинами, а их углеводные остатки необходимы для взаимодействия с белками иммунной системы [1] и выполнения эффекторных функций, таких как антителозависимая клеточная цитотоксичность и комплементзависимая цитотоксичность [2]. Состав и структура углеводных цепей антитела влияют на сродство к про- и противовоспалительным рецепторам FcγR, неонатальному рецептору FcRn, рецептору DC-SIGN и компоненту C1q системы комплемента [3]. Иммуноглобулины IgG содержат один консервативный сайт *N*-гликозилирования Asn²⁹⁷, расположенный в СН₂-домене тяжелой цепи, а масса углеводной части составляет 2–3% от массы молекулы [4].

N-Гликаны иммуноглобулинов IgG представляют собой разветвленные олигосахариды, которые состоят из инвариантной центральной части и некоторого набора дополнительных углеводных остатков (рис. 1). Профиль гликозилирования иммуноглобулинов IgG у людей разнообразен; обнаружено более 30 различных гликоформ тяжелой цепи [4–6]. Фукозилированные гликаны антител IgG человека, которые составляют более

92% от общего числа углеводных цепей, подразделяют на три основных гликоформы: G0F, G1F и G2F в зависимости от числа терминальных остатков галактозы (рис. 1).

В процессе разработки терапевтических рекомбинантных антител значительное внимание уделяют не только их антигенсвязывающим свойствам, но также и их профилю гликозилирования, от которого зависит способность антител проявлять эффекторные функции. В настоящее время многие рекомбинантные антитела производят в клетках китайского хомячка СНО и их производных [7]. Профиль гликозилирования человеческих антител IgG, благодаря чему такие антитела успешно применяют для лечения людей [7], однако в каждом конкретном случае возможность их терапевтического применения необходимо подтверждать.

Ранее было сконструировано рекомбинантное химерное антитело ch14D5a против вируса клещевого энцефалита, обладающее высоким сродством к поверхностному гликопротеину Е этого вируса и проявляющее высокую протективную активность на мышинной модели клещевого энцефалита [8]. Целью данной работы было исследование профиля гликозилирования антитела ch14D5a методом ферментативного дегликозилирования и гидролиза антитела с последующим масс-спектрометрическим анализом пептидных продуктов.

¹ Статья публикуется по материалам сообщения, представленного на конференции “Химическая биология-2016”; г. Новосибирск, 24–29 июля 2016 г.

Сокращения: СНО – chinese hamster ovary (клетки китайского хомячка).

Автор для связи (тел.: (383)363-51-57, e-mail: ivan_baykov@mail.ru).

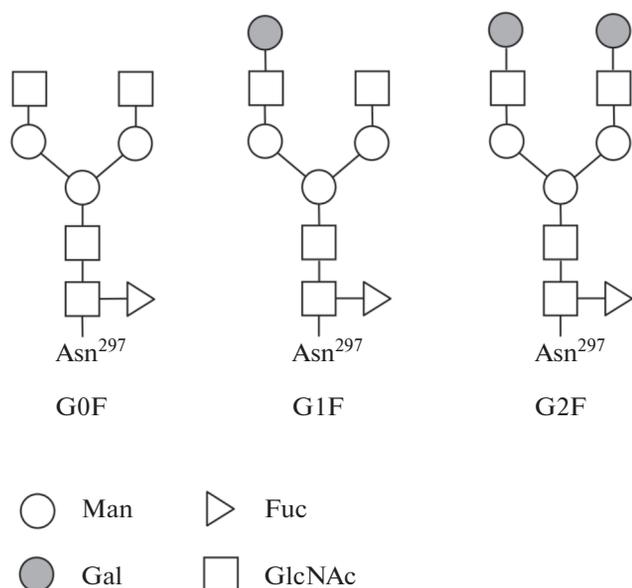


Рис. 1. Структура углеводных остатков гликоформ G0F, G1F и G2F иммуноглобулинов IgG человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для анализа профиля гликозилирования антитела ch14D5a образец белка дегликозилировали *N*-гликозидазой F (пептид-N4-ацетил-β-глюкозаминил)аспарагин-амидаза, КФ 3.5.1.52), после чего электрофоретически разделили на тяжелые и легкие цепи (рис. 2). Подвижность легких цепей при этом оставалась на уровне контроля, а подвижность тяжелых цепей увеличивалась по

сравнению с контролем. Этот результат свидетельствует о том, что обе тяжелых цепи антитела *N*-гликозилированы.

Легкие и тяжелые цепи дегликозилированного антитела разделяли электрофоретически и гидролизовали по отдельности трипсином с последующим масс-спектрометрическим анализом. Полученные спектры сравнили со спектрами легкой и тяжелой цепей исходного антитела ch14D5a, а также контрольного образца антитела, который был инкубирован в тех же условиях, что и для дегликозилирования, но без добавления *N*-гликозидазы F. В спектрах легких цепей не было выявлено сдвигов и других существенных отличий, поэтому можно считать, что *N*-гликозилирование легких цепей антитела ch14D5a отсутствует, что нормально для подавляющего большинства иммуноглобулинов G [7].

В масс-спектрах продуктов трипсинолиза тяжелых цепей было обнаружено несколько пиков, для которых отношение массы к заряду m/z изменилось при дегликозилировании (рис. 3, таблица). В частности, масс-спектр триптических фрагментов тяжелой цепи исходного антитела ch14D5a не содержал пика 1189.51, соответствующего пептиду EEQYNSTYR (здесь и далее подчеркнут остаток Asn²⁹⁷), а также пиков 1671.81 и 2978.50, соответствующих пептидам TKPREEQYNSTYR и EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK, которые могли образоваться при неполном гидролизе белка трипсином (рис. 4). В масс-спектре тяжелой цепи дегликозилированного антитела присутствовал пик 1190.52, который соответствует пептиду EEQYDSTYR (при дегликозилировании

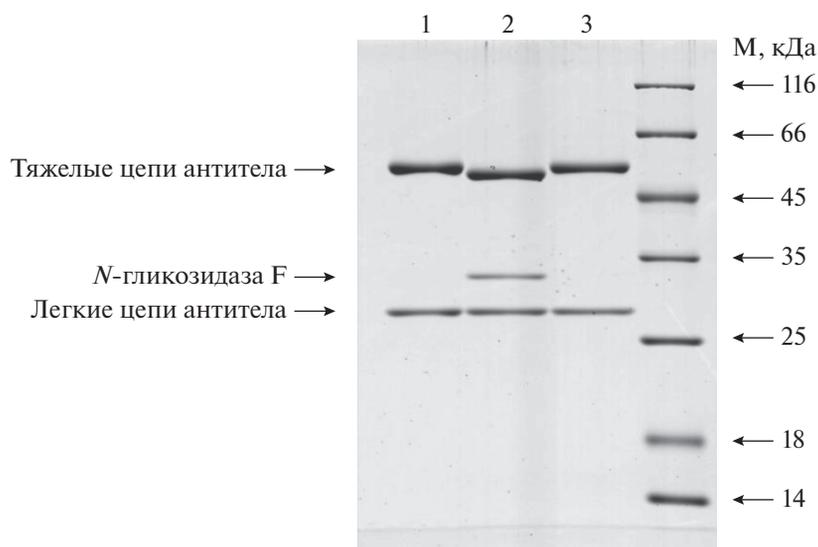


Рис. 2. 12% ПААГ-электрофорез в восстанавливающих условиях дегликозилированного антитела ch14D5a (2), антитела ch14D5a, выдержанного в реакционном буфере, но без добавления фермента (1) и интактного антитела ch14D5a (3). М — белковый маркер молекулярных масс.

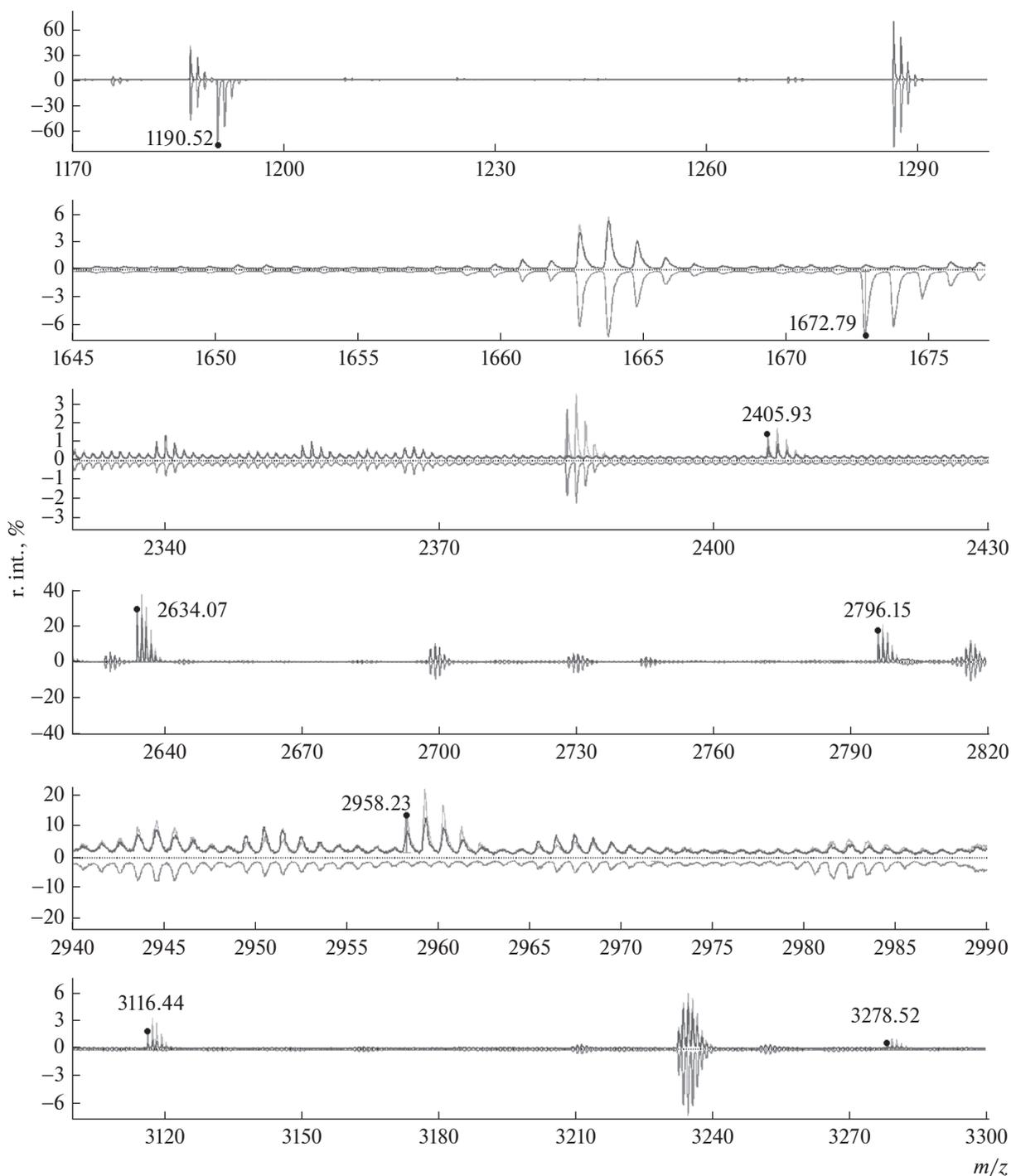


Рис. 3. “Зеркальное” сравнение масс-спектров продуктов трипсинолиза тяжелой цепи антитела ch14D5a до и после дегликозилирования. Верхняя область (положительные значения оси ординат) каждого отрезка диапазона m/z содержит фрагменты спектра интактного антитела (светло-серый) и антитела, инкубированного в буфере без добавления *N*-гликозидазы (серый); нижняя область (отрицательные значения оси ординат) содержит фрагменты перевернутого спектра дегликозилированного антитела. Значения оси ординат соответствуют относительной интенсивности ионного потока в процентах. Спектры получены в положительном линейном режиме.

остаток аспарагина превращается в остаток аспарагиновой кислоты $\text{Asn} \rightarrow \text{Asp}$ [9]). Это наблюдение подтверждает гликозилирование тяжелых цепей антитела ch15D5a.

Чтобы оценить наличие основных гликоформ, присутствующих в образце антитела ch14D5a, были проанализированы значения сдвигов в спектрах тяжелых цепей исходного и дегликозилированного

Экспериментально установленные значения m/z в масс-спектрах триптических фрагментов тяжелых цепей, полученных из интактного антитела ch14D5a, а также антител, инкубированных в реакционном буфере с добавлением *N*-гликозидазы F и без нее

Пептид*	Моноизотопная масса [$M + H$] ⁺ (m/z при $z = 1$)	ch14D5a		
		интактный	инкубированный без гликозидазы	инкубированный с гликозидазой
EEQY <u>D</u> STYR	1190.52	–	–	+
TKPREEQY <u>D</u> STYR	1672.79	–	–	+
EEQY <u>N</u> (G0F)STYR	2634.07	+	+	–
EEQY <u>N</u> (G1F)STYR	2796.15	+	+	–
EEQY <u>N</u> (G2F)STYR	2958.23	+	+	–
TKPREEQY <u>N</u> (G0F)STYR	3116.44	+	+	–
TKPREEQY <u>N</u> (G1F)STYR	3278.52	+	+	–

* В скобках указаны названия гликанов, связанных ковалентно с остатком Asp²⁹⁷, в соответствии с рис. 1. Подчеркнуты аминокислотные остатки Asp²⁹⁷ и Asn²⁹⁷.

антител, которые составили $2634.07 - 1190.52 = 1443.55$ Да, $2796.15 - 1190.52 = 1605.63$ Да и $2958.23 - 1190.52 = 1767.71$ Да (рис. 3, таблица). Полученные значения сдвига массы не несут полной информации о структуре гликозильных остатков, однако они полностью соответствуют гликоформам G0F, G1F и G2F (рис. 1). Поскольку эти гликоформы являются наиболее распространенными для рекомбинантных антител, получаемых в культурах клеток CHO [10, 11], то с высокой долей вероятности можно предположить, что рекомбинантное антитело ch14D5a, полученное в клетках CHO-K1, присутствует преимущественно в гликоформах G0F, G1F и G2F.

В спектрах был также обнаружен сдвиг 1216.42 Да. Это значение, видимо, соответствует гликоформе MAN5, которую иногда обнаруживают в антителах, получаемых в клетках CHO [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате данного исследования установлено, что антитело ch14D5a полностью *N*-гликозилировано по остатку Asn²⁹⁷ обеих тяжелых цепей, а основные гликоформы предположительно соответствуют гликоформам G0F, G1F и G2F, наиболее типичным для иммуноглобулинов IgG че-

ловека и для антител, секретируемых клетками CHO. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при профилактическом или терапевтическом применении против вируса клещевого энцефалита это антитело способно проявлять в организме человека эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточная цитотоксичность и комплементзависимая цитотоксичность.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы химерного антитела ch14D5a были получены в Лаборатории молекулярной иммунологии ИХБФМ СО РАН по методике, описанной ранее [8]. Клетки CHO-K1 использовали из внутреннего банка клеток ИХБФМ СО РАН.

Дегликозилирование антитела ch14D5a. Антитела дегликозилировали *N*-гликозидазой F (New England Biolabs). Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 10 мкг антитела и 1 мкл буфера "10× Glycoprotein Denaturing buffer", которым была укомплектована *N*-гликозидаза F, инкубировали 5 мин при 95°C. Смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли 2 мкл буфера "10× GlycoBuffer 2", 2 мкл 10% раствора Nonidet P-40, которые также присутствовали в комплекте с *N*-гликозидазой F, 1 мкл *N*-гликозидазы F

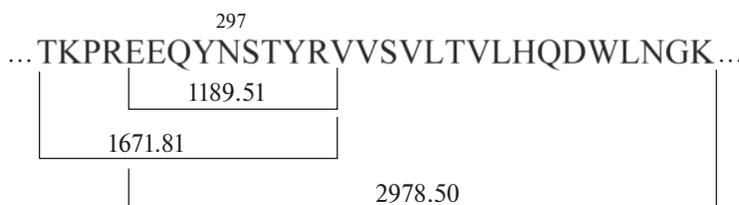


Рис. 4. Пептиды, образующиеся при полном и неполном гидролизе трипсином негликозилированной тяжелой цепи антител ch14D5a и ch14D5b, а также их моноизотопные массы.

(500 ед. акт./мкл) и 6 мкл воды. Инкубировали 1 ч при 37°C. Контрольный образец антитела был инкубирован в тех же условиях, но без добавления фермента.

Масс-спектрометрический анализ антител. Для анализа масс триптических фрагментов образец анализируемого белка разделяли электрофорезом в 12% ПААГ в восстанавливающих условиях, окрашивали красителем “Coomassie Brilliant Blue R-250” и вырезали необходимый фрагмент геля, содержащий легкую или тяжелую цепь. Фрагмент геля измельчали, удаляли краситель попеременной инкубацией в 50% водном растворе ацетонитрила, содержащем 50 мМ NH₄HCO₃, и в 100% ацетонитриле. В каждом растворе гель выдерживали по 10 мин с интенсивным встряхиванием, отмывку повторяли три раза. Белок гидролизовали в геле трипсином “Sequencing Grade Modified Trypsin” (Promega), согласно инструкции производителя, в течение ночи. Пептиды экстрагировали из геля 50 мкл 25 мМ NH₄HCO₃, высушивали на вакуумном испарителе “Concentrator Plus” (Eppendorf) и обессоливали с помощью наконечников ZipTip_{C18} (Millipore) согласно рекомендациям производителя. Обессоленные образцы передавали в Центр масс-спектрометрического анализа ИХБФМ СО РАН, где их кристаллизовали с 2,5-дигидроксibenзойной кислотой и анализировали на времяпролетном MALDI-масс-спектрометре “Autoflex speed” (Bruker) в диапазоне $m/z = 500-4000$ в положительном линейном режиме. Спектры анализировали с помощью программного обеспечения mMass v. 5.5.0 (by Martin Strohal, PhD). Для моделирования продуктов триптического гидролиза использовали сервис

ExPASy PeptideMass (http://web.expasy.org/peptide_mass/).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 16-14-00083.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shade K.C., Anthony R.M.* // *Antibodies*. 2013. V. 2. P. 392–414.
2. *Anthony R.M., Wermeling F., Ravetch J.V.* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2012. V. 1253. P. 170–180.
3. *Vidarsson G., Dekkers G., Rispen T.* // *Front. Immunol.* 2014. V. 5. P. 520.
4. *Arnold J.N., Wormald M.R., Sim R.B., Rudd P.M., Dwek R.A.* // *Annu. Rev. Immunol.* 2007. V. 25. P. 21–50.
5. *Jefferis R.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 2012. V. 526. № 2. P. 159–166.
6. *Zauner G., Selman M.H., Bondt A., Rombouts Y., Blank D., Deelder A.M., Wuhrer M.* // *Mol. Cell Proteomics*. 2013. V. 12. № 4. P. 856–865.
7. *Raju T.S.* // *Bioprocess Int.* 2003. V. 1. P. 44–54.
8. *Baykov I.K., Matveev A.L., Stronin O.V., Ryzhikov A.B., Matveev L.E., Kasakin M.F., Richter V.A., Tikunova N.V.* // *Vaccine*. 2014. V. 32. № 29. P. 3589–3594.
9. *Plummer T.H., Jr., Elder J.H., Alexander S., Phelan A.W., Tarentino A.L.* // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. № 17. P. 10700–10704.
10. *Routier F.H., Davies M.J., Bergemann K., Hounsell E.F.* // *Glycoconj. J.* 1997. V. 14. № 2. P. 201–207.
11. *van Berkel P.H., Gerritsen J., Perdok G., Valbjørn J., Vink T., van de Winkel J.G., Parren P.W.* // *Biotechnol. Prog.* 2009. V. 25. № 1. P. 244–251.
12. *Pacis E., Yu M., Autsen J., Bayer R., Li F.* // *Biotechnol. Bioeng.* 2011. V. 108. № 10. P. 2348–2358.

N-Glycosylation Profile Analysis of Protective Chimeric Antibody ch14D5a Against Tick-Borne Encephalitis Virus

I. K. Baykov*., A. L. Matveev*, I. G. Kondratov**, and N. V. Tikunova*

*E-mail: ivan_baykov@mail.ru

**Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrentieva 8, Novosibirsk 630090, Russia*

***Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Ulan-Batorskaya 3, Irkutsk 664033, Russia*

An N-glycosylation profile analysis was performed for chimeric antibody ch14D5a against tick-borne encephalitis virus. It was found that antibody ch14D5a is completely N-glycosylated at 297 asparagine residue of both heavy chains and the major glycoforms are supposedly glycoforms G0F, G1F and G2F. These glycoforms are the most typical for human immunoglobulins IgG and for antibodies produced in CHO cells.

Keywords: immunoglobulins, glycosylation, tick-borne encephalitis virus, mass-spectrometry