

УДК 577.112.5

**DE NOVO СЕКВЕНИРОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА  
АДАЛИМУМАБ**

**Малышева Н.А.** (Университет ИТМО)

**Научный руководитель – Горбунов А.Ю.**

(ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека»  
ФМБА России)

**Введение.** Моноклональные антитела (мАТ) широко используются в научных исследованиях и практической медицине. Для первоначального получения мАТ применяется гибридная технология: выделенные из организма иммунизированного животного (как правило, мыши) лимфоциты иммортализируются путём слияния с опухолевыми клетками, и полученные клональные линии гибридных клеток служат продуцентами мАТ. Альтернативным подходом является наработка рекомбинантных мАТ в культивируемых клетках млекопитающих, обычно используемых в качестве продуцентов рекомбинантных белков, таких как НЕК293 и СНО. Для определения нуклеотидных последовательностей, кодирующих переменные участки лёгкой (VL) и тяжёлой (VH) цепей мАТ, из клеток продуцирующей гибридной линии выделяют РНК, путём обратной транскрипции получают кДНК и амплифицируют соответствующие фрагменты путём ПЦР. Полученные ампликоны секвенируют и субклонируют в специализированный экспрессионный плазмидный вектор для последующей высокоэффективной экспрессии мАТ в продуцирующих клетках. Для большинства мАТ, полученных из сторонних источников, VL- и VH-кодирующие нуклеотидные последовательности не известны. В этом случае эффективным решением является масс-спектрометрическое *de novo* секвенирование. На основании полученных аминокислотных последовательностей лёгкой и тяжёлой цепей мАТ могут быть определены нуклеотидные последовательности, кодирующие VL и VH. Соответствующие фрагменты ДНК далее могут быть синтезированы, амплифицированы путём ПЦР и субклонированы в специализированный экспрессионный вектор. Такой подход часто называют "обратной разработкой антител". В данной работе нами была разработана и оптимизирована процедура *de novo* секвенирования мАТ. В качестве модельного мАТ с известной аминокислотной последовательностью был выбран медицинский препарат Адалимумаб (Humira), который представляет собой рекомбинантное мАТ против фактора некроза опухолей  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и применяется для лечения ревматоидного артрита, болезни Крона, бляшечного псориаза и других заболеваний.

**Основная часть.** В основе метода *de novo* секвенирования лежит хромато-масс-спектрометрический анализ множественных ферментативных гидролизатов. На первом этапе проводили декликозилирование мАТ с использованием фермента N-гликозидазы F (PNGase F). Далее декликозилированное мАТ разделяли на шесть фракций и проводили ферментативный гидролиз с использованием следующих ферментов: трипсин, пепсин, химотрипсин, эластаза, а также комбинации эндопротеиназ AspN/LysC и GluC/LysC. Хромато-масс-спектрометрический анализ полученных гидролизатов проводили на ВЭЖХ/МС-системе, состоящей из жидкостного хроматографа и времяпролетного масс-спектрометра с разделением по ионной подвижности. Компоненты пробы разделяли в режиме градиентного элюирования. Для проведения *de novo* секвенирования полученные фрагментные масс-спектры пептидов анализировали с помощью программного обеспечения. Вкратце, алгоритм секвенирования *de novo* с использованием ПО реализуется следующим образом: фрагментные масс-спектры шести гидролизатов используются для получения

пептидных меток *de novo*, параллельно осуществляется поиск в базе данных белковых последовательностей, далее секвенированные *de novo* пептиды объединяются с пептидами, обнаруженными в базе данных, и совокупность полученных пептидных последовательностей обрабатывается с использованием графа де Брейна для сборки последовательностей лёгкой и тяжёлой цепей мАТ со 100% покрытием.

**Выводы.** Разработаны и оптимизированы процедуры пробоподготовки и хромато-масс-спектрометрического анализа мАТ на примере препарата Адалimumаб, что позволило получить полную аминокислотную последовательность данного мАТ с использованием специализированного ПО. Предложенный рабочий процесс может быть использован для проведения *de novo* секвенирование других мАТ.

**Список использованных источников:**

1. Jinrui Gan, Tim Welsink, Detlev Suckau, Carsten Hopf. Complete *de novo* sequencing of a human immunoglobulin G using multiple enzyme digests and LC-ESI-QTOF-MS/MS analysis // Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany — 2020.
2. Вяткина К. В. *De novo* секвенирование белков и пептидов: алгоритмы, приложения, перспективы // Biomedical Chemistry: Research and Methods — 2018.