

УДК 577.27' 112.825

Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения

С. М. Деев, Е. Н. Лебеденко

Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
Российской академии наук, Москва
e-mail: dejev@ibch.ru

РЕФЕРАТ Модулярная структура и многофункциональность антител позволяет модифицировать природные иммуноглобулины различными способами для всевозможных клинических применений. Рациональный компьютерный дизайн и методы молекулярной инженерии дают возможность направленно модифицировать размер, аффинность, специфичность, иммуногенность и эффекторные функции антител, а также комбинировать их с другими действующими агентами. В обзоре рассмотрены современные методы инженерии иммуноглобулинов, ориентированных на применение в диагностике и терапии различных заболеваний, в т.ч. новые технологии, направленные на оптимизацию эффекторных функций терапевтических антител. Ключевые слова: моноклональные антитела, гуманизированные антитела, одноцепочечные антитела, мультивалентность, биспецифичность, направленная доставка, модуль барназа:барстар, иммунодибарназа.

Сокращения: АЗКЦ – антителозависимая клеточная цитотоксичность; КЗЦ – комплементзависимая цитотоксичность; мкАТ – моноклональные антитела; СH и CL – константные домены тяжелой и легкой цепей антитела; клетки СНО – клетки яичника китайского хомячка; EGFR (HER1) – рецептор эндотелиального фактора роста, раковый маркер; Fab – антигенсвязывающий фрагмент антитела; Fc – константный (кристаллизующийся) фрагмент антитела; FcγR – клеточные рецепторы Fc-фрагментов антител; FcRn – неонатальный рецептор Fc-фрагментов антител; HER1 и HER2/neu – раковые маркеры группы тирозинкиназных рецепторов; IgA, IgG, IgD, IgE, IgM – иммуноглобулины A, G, D, E, M (антитела классов A, G, D, E, M); scFv – одноцепочечный переменный фрагмент антитела, PSMA – простатоспецифичный мембранный антиген; VEGF – эндотелиальный фактор роста сосудов; VH и VL – переменные домены тяжелой и легкой цепей антитела.

ВВЕДЕНИЕ

Столетие назад антитела представлялись той «магической пулей», которая сможет избирательно поражать очаги заболевания в организме человека (см. Нобелевскую лекцию Пауля Эрлиха в 1908 г. [1]). Однако только в 1975 г. благодаря работе Келлера и Мильштейна, положившей начало гибридомной технологии получения моноклональных антител, эта идея Пауля Эрлиха начала обретать практические очертания. Гибридомная технология позволяет получать в ответ на иммунизацию антигеном не набор разнообразных иммуноглобулиновых молекул (природные антитела), а антитело одного вида, направленное против одного специфичного антигена (моноклональное антите-

ло, мкАТ). Эта методология до сих пор остается краеугольным камнем инженерии антител. К сожалению, первые попытки применить мышиные мкАТ для клинических целей оказались далеки от успеха и выявили, как казалось, труднопреодолимые недостатки мкАТ: в ряде случаев низкую аффинность по сравнению с поликлональной антисывороткой; высокую иммуногенность по отношению к человеку и, как следствие, быстрое выведение из организма; неспособность задействовать систему комплемента и клеточные механизмы иммунного ответа в чужеродной системе. Несмотря на это, после трех десятилетий борьбы и поражений, надежд и рекламной шумихи мкАТ окончательно утвердились как лекарственные препара-

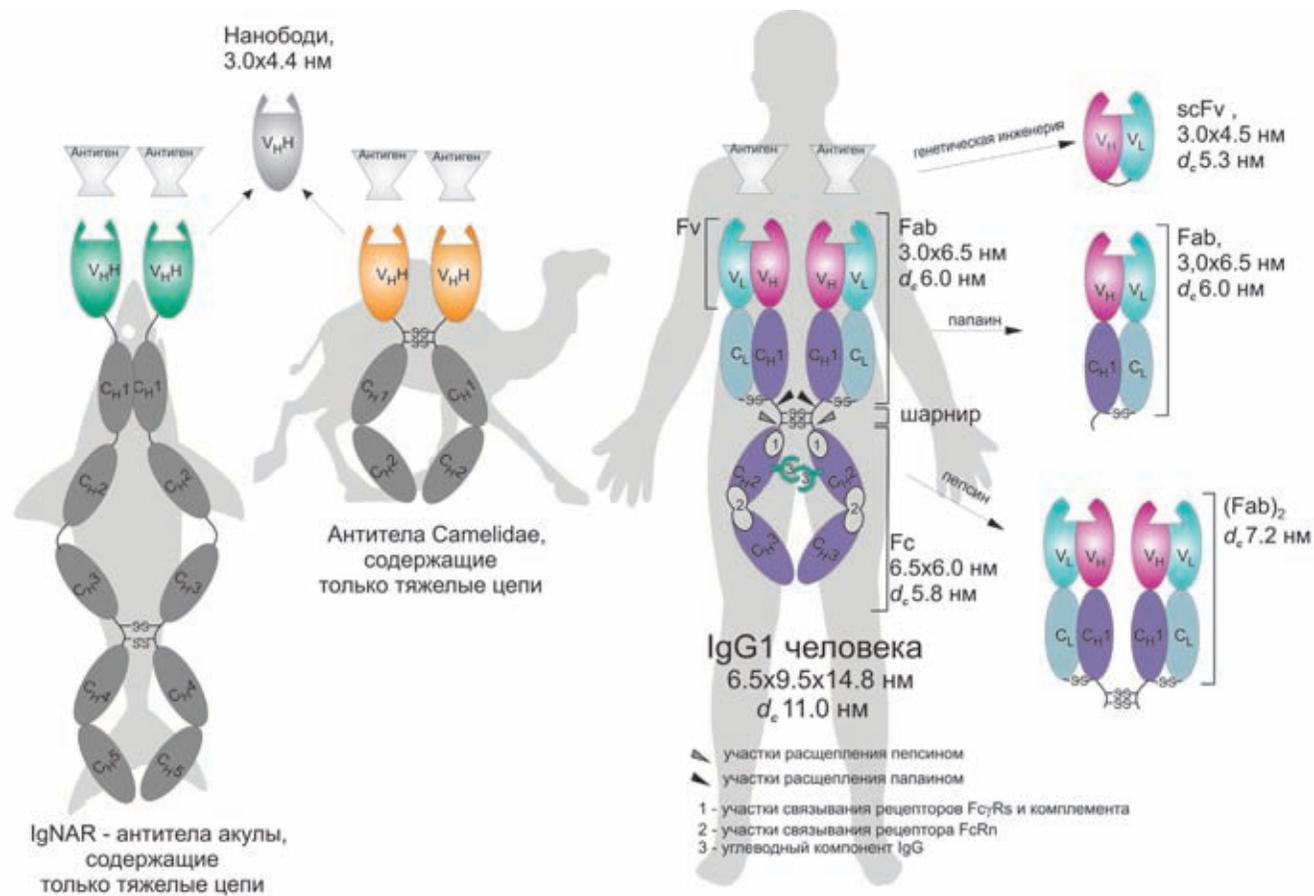


Рис. 1. Природные антитела и их фрагменты [9]. Fab и (Fab)₂ – антигенсвязывающие фрагменты IgG, получаемые с помощью гидролиза папаином и пепсином соответственно; Fc – С-концевая часть IgG, состоящая из константных доменов CH2 и CH3 тяжелых цепей, отвечает за эффекторные функции; Fv – переменный фрагмент, состоящий из переменных доменов легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей; scFv – одноцепочечный переменный фрагмент, состоящий из VL и VH (объединенных генно-инженерным способом); VNH – наноантитело, переменный домен антител хрящевых рыб и рода Camelidae, содержащих только тяжелые цепи; -S-S- – дисульфидная связь. Указаны линейные размеры антител и их фрагментов, измеренные методом атомно-силовой микроскопии [2, 3], а также гидродинамический диаметр d_c, вычисленный по уравнению Стокса-Эйнштейна [4, 5]

ты, успешные как в клиническом, так и в коммерческом плане (табл. 1). Реализовать уникальный потенциал иммуноглобулинов, имеющих модулярную структуру и набор функций, связанных с отдельными структурными модулями, и модифицировать их для самых различных клинических применений удалось благодаря технологиям генетической инженерии и трансгенных животных. В зависимости от практической задачи исследователи могут изменять размер антител, их специфичность, аффинность, валентность, уменьшать иммуногенность, оптимизировать фармакокинетические свойства и эффекторные функции. В дополнение к этому, антитела получают в виде рекомбинантных составных белков, включающих антитела другой специфичности, цитокины, белковые токсины и радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные белки. В настоящее время приняты для клинического применения около 30 препаратов антител, из них 89 % предназначено для онкологического и иммунологического применения, антитела используют также в трансплантологии, для лечения сердечно-сосудистых, аутоиммунных и инфекционных заболеваний (табл. 2). На фармацевтическом рынке антитела занимают второе

место по объему производства после вакцин. К 2011 г. прогнозируется увеличение продаж терапевтических препаратов антител до 21 млрд долларов США (табл. 1). Более 85 % разрешенных для клинического применения антител являются продуктами инженерии антител, к ним

Табл. 1. Коммерческий успех некоторых мКАТ, применяемых в онкологии [Deonarain, 2008]

Название антитела: коммерческое/ по номенклатуре USAN ¹	Продажа в 2005-2006 гг., млн \$ США	Увеличение продаж в процентах по отношению к предыдущему году	Оценка рынка продаж в 2011 г., млн \$ США
Rituxan®/ rituximab	3800	16	6300
Herceptin®/ trastuzumab	3100	82	4800
Avastin®/ bevacizumab	2400	77	7800
Erbix®/ cetuximab	1100	57	2100

¹ В настоящее время во всем мире используют номенклатуру моноклональных антител и их фрагментов, принятую в США (USAN – US Adopted Names; www.ama-assn.org), см. табл. 3.

ОБЗОРЫ

Табл. 2. Препараты моноклональных антител, разрешенных к клиническому применению, и возможные осложнения при их применении.

Область применения	Коммерческое название	Наименование по USAN ¹	Формат антитела	Мишень
Терапия опухолевых заболеваний	Avastin®	Bevacizumab	IgG1 гуманиз.	VEGF
	Bexxar®	¹³¹ I-Tositumomab	¹³¹ I-IgG2a мыши	CD20 (В-клетки)
	Campath®	Alemtuzumab	IgG1 гуманиз.	CD52
	Erbix®	Cetuximab	IgG1 химерное	EGFR
	Herceptin®	Trastuzumab	IgG1	HER2
	Mylotarg®	Gentuzumab ozogamicin	Конъюгат гуманиз. IgG4-калихеамицин	CD33
	Prostascint®	Capromab pentetate	¹¹¹ In-IgG1 мыши	PSMA, prostate specific membrane antigen
	Rituxan®	Rituximab	IgG1 химерн.	CD20 (В-клетки)
	Vectibix®	Panitumumab	IgG2 человека	EGFR (HER1)
	Zevalin®	Ibritumomab tiuxetan	⁹⁰ Y-IgG1 мыши	CD20 (В-клетки)
Трансплантология	Orthoclone OKT3®	Muromonab-CD3	IgG2a мыши	CD3 (Т-лимфоциты)
	Simulect®	Basiliximab	IgG1 химерн.	CD25
	Zenapax®	Daclizumab	IgG1 гуманиз.	CD25
Сердечно-сосудистые заболевания	ReoPro®	Abciximab	F(ab)-химерный фрагмент IgG1	Комплекс гликопротеинов IIb-IIIa
	Монафрам®		Фрагмент F(ab') ₂ IgG1 мыши.	Комплекс гликопротеинов IIb-IIIa на тромбоцитах
Терапия аутоиммунных заболеваний	Humira®	Adalimumab	IgG1 человека	TNFα
	Raptiva®	Efalizumab	IgG1 гуманиз.	CD11a
	Remicade®	Infliximab	IgG1 химерн.	TNFα
	Tysabri®, Antegren®	Natalizumab	IgG4 гуманиз.	Субъединица α4 интегринов α4β1 и α4β7
	Xolair®	Omalizumab	IgG1 гуманиз.	IgE
Другие	Lucentis®	Ranibizumab	F(ab)-гуманиз.фрагмент IgG1	VEGF
	Synagis®	Palivizumab	IgG1 гуманиз.	F-белок респираторного синцитиального вируса

¹ В настоящее время во всем мире используют номенклатуру моноклональных антител и их фрагментов, принятую в США (USAN – US Adopted Names; www.ama-assn.org), см. табл. 3.

относятся химерные, гуманизированные и полностью человеческие мкАТ, антитела, полученные с помощью фогового дисплея, генно-инженерные конъюгаты антител с цитокинами и токсинами. В стадии клинических испытаний находятся сотни производных антител, включающих антитела неприродного формата, полученные генно-инженерными способами: биспецифические антитела, одноцепочечные полноразмерные антитела, различные варианты укороченных антител, в т.ч. димеры и мономер-

ры Fab-фрагментов, scFv-фрагменты (одноцепочечные мини-антитела), однодоменные антитела (наноантитела) и др. В настоящем обзоре будут рассмотрены различные технологические приемы, позволяющие модифицировать молекулы иммуноглобулинов для конкретных клинических применений. Наибольшее внимание будет уделено инженерии антител для лечения и диагностики опухолевых заболеваний, поскольку именно в этой области особенно велика потребность в таких препаратах.

ОБЗОРЫ

	Применение, механизм действия (указано усиление ↑ или ослабление ↓ эффекта)	Фирма и год регистрации	Возможные осложнения при применении [http://www.i-sis.org.uk/WOFAMAD.php]
	Рак кишечника. Связывание с лигандом, антагонист. Ангиогенез ↓, метастазирование ↓.	Genentech, 2004	Желудочно-кишечные перфорации и расхождение раны, в некоторых случаях с летальным исходом.
	Неходжжинская лимфома. Радиоиммунотерапия, ADCC, CDC	GlaxoSmithkline, 2003	Реакции гиперчувствительности, включая анафилаксию.
	В-клеточная хроническая лимфоцитарная лейкемия	Genzyme/Schering, 2001	Снижение кроветворных функций костного мозга, в некоторых случаях – тяжелое, вплоть до летального исхода.
	Метастатический рак кишечника, головы и шеи. Антагонист рецептора. Апоптоз ↑, хемо- и радиочувствительность ↑, пролиферация ↓, ангиогенез ↓, метастазирование ↓.	Imclone/Bristol-Myers Squibb, 2004	В 3 % случаев анафилактические реакции (бронхоспазм, хриплое дыхание, гипотензия), редко с летальным исходом (1 на 1000).
	HER2-положительный метастатический рак груди. Проллиферация ↓, ангиогенез ↓, хемочувствительность ↑	Genentech, 1997	Кардиомиопатия.
	CD33-положительная острая миелоидная лейкемия. Инттоксикация клеток за счет индукции разрывов ДНК	Wyeth pharmaceuticals, 2000	Тяжелые реакции гиперчувствительности, включая анафилаксию, гепатотоксичность и гематологическую токсичность.
	Диагностика рака простаты	Cytogen, 1996	Анафилактические или анафилактоидные реакции при однократном введении. При повторном введении – угроза жизни из-за серьезных системных реакций сердечно-сосудистой, дыхательной и нервной систем (шок, остановка сердца и дыхания, паралич).
	Неходжжинская лимфома. хемочувствительность, ADCC, CDC	Genentech/Biogen, 1997	Реакции на внутривенное вливание. Анафилактический шок с летальным исходом.
	Рак кишечника. Антагонист рецептора. Апоптоз ↑, хемо- и радиочувствительность ↑?, пролиферация ↓, ангиогенез ↓, метастазирование ↓.	Amgen, 2006	Нет данных
	Неходжжинская лимфома. Радиоиммунотерапия, апоптоз ↑	Biogen IDEC, 2002	Схема лечения препаратом включает Rituxan® (см. выше).
	Профилактика острого отторжения при пересадке почки. Блокирование активности Т-киллеров.	Ortho Biotech, 1986	Аллергические и анафилактические реакции, в том числе: сердечно-сосудистый коллапс, остановка сердца и дыхания, судороги, отек мозга, слепота, паралич.
	Профилактика острого отторжения при пересадке почки. Блокирование IL-2R.	Novartis, 1998	Тяжелые анафилактические реакции (через 24 ч), включая: гипотензию, бронхоспазм, остановку дыхания и сердца, аритмию, отек легких, лихорадку, потерю сознания.
	Профилактика острого отторжения при пересадке почки. Блокирование IL-2R.	Roche, 1999	Тяжелые анафилактические реакции (через 24 ч), включая: гипотензию, бронхоспазм, остановку дыхания и сердца, аритмию, отек легких, лихорадку, потерю сознания.
	Профилактика тромбоза. Антагонист гликопротеинов IIb-IIIa	Centocor/Elli Lilly, 1994	Нарушения пищеварения, изжога, отрыжка, зуд, онемелость; нарушения нервной системы, деменция.
	Профилактика тромбоза артерий при коронаропластике. Антагонист гликопротеинов IIb-IIIa	Фрамон ООО, Россия, 2002	Кровотечения, аллергические реакции, тромбоцитопения (единичные случаи глубокой тромбоцитопении), иммунный ответ в 5-6 % случаев
	Ревматоидный артрит, псориаз. Блокирование активности TNFα, воспаление ↓	Abbott Laboratories, 2002	Туберкулез, грибковая инвазия и другие инфекции, острая миелоидная лейкемия.
	Псориаз. Блокирование активации Т-лимфоцитов	Genentech/Xoma, 2003	Гемолитическая анемия, серьезные инфекции, включая туберкулезную пневмонию, бактериальный сепсис, при антимикробной терапии
	Болезнь Крона, ревматоидный артрит, воспалительные заболевания. Блокирование активности TNFα, воспаление ↓	Centocor, 1998	Туберкулезная инфекция, иногда со смертельным исходом.
	Множественный склероз. Угнетение миграции иммунных клеток в очаг воспаления.	Biogen Idec/Elan, 2004	Продажа приостановлена в 2005 г. Прогрессирующая лейкоэнцефалопатия в 1 случае продолжительного приема препарата.
	Аллергическая астма. Препятствует выходу IgE из тучных клеток.	Genentech, 2002	Возникновение или рецидив рака.
	Возрастная дегенерация сетчатки глаза. Блокировка ангиогенеза.	Genentech/ Novartis, 2006	Аллергические реакции, интраокулярное воспаление, ретинальные кровоизлияния.
	Профилактика инфекции респираторным синцитиальным вирусом.	Medimmune, 1998	В редких случаях острая гиперчувствительность, при повторном введении (1 на 100 тыс.) анафилаксия.

1. КАК УСТРОЕНО ПРИРОДНОЕ АНТИТЕЛО И ПОЧЕМУ ЕГО ПОТРЕБОВАЛОСЬ ВИДОИЗМЕНИТЬ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

Антитела, или иммуноглобулины (IgG), – это высокоспецифичные молекулы, которые способны узнавать и удалять из организма чужеродные антигены. Большинство антител млекопитающих обладают сходным общим строением и представляют собой бивалентные мультидоменные белки с двумя антиген-связывающими участками

(иммуноглобулин G (IgG) человека, *рис. 1*). Этот сложный Y-образный молекулярный комплекс состоит из двух идентичных тяжелых (~50 кДа) и двух идентичных легких (~25 кДа) цепей. Четыре междоменные дисульфидные связи обеспечивают стабилизацию всего молекулярного комплекса. Глобулярные структурные домены иммуноглобулинов с характерной β-складчатой структурой стабилизированы внутримолекулными дисульфидными связями и подразделяются на переменные (V) и константные

(С) домены. N-концевые домены легких и тяжелых цепей (вариабельные домены VL и VH) значительно варьируют у разных антител, остальная часть обеих полипептидных цепей (константные домены CL и CH) различается у разных классов антител, а также имеет видовую специфичность у антител одного класса. Структурные домены иммуноглобулина не только обособлены в пространстве, но и выполняют разные функции в процессе иммунного ответа.

Каждое антитело обладает уникальной специфичностью и высоким сродством (K_D 10^{-8} - 10^{-11} M) к своему антигену, которое обеспечивается комплементарностью антиген-связывающего участка антитела определенному участку молекулы антигена (эпитопу). Каждый антиген-связывающий участок сформирован двумя вариабельными доменами VH и VL, принадлежащими соответственно тяжелой и легкой цепям иммуноглобулина. В каждом из вариабельных доменов VH и VL выделяют по три гипервариабельные области, которые отвечают за комплементарность взаимодействия (англ. CDR – complementarity determined regions). Способность антител связывать одновременно два антигена значительно увеличивает функциональную аффинность (авидность) иммуноглобулинов и увеличивает время удерживания на поверхностных клеточных рецепторах и других поливалентных антигенах. Всего у человека известно пять классов антител (IgM, IgG, IgE, IgD и IgA). Недавно у некоторых организмов (верблюд, лама, акула) обнаружены неканонические антитела, полностью лишенные легких цепей, с двумя антиген-связывающими

участками, каждый из которых образован только одним вариабельным доменом тяжелой цепи. Такие вариабельные домены верблюда получили название «наноантител» (англ. nanobody) (рис. 1).

Константная часть иммуноглобулина состоит из одного домена у легких цепей (CL) и трех или четырех доменов (в зависимости от класса) у тяжелых цепей (CH). Гидрофобные участки на границе CH1 и CH2-доменов сохраняют относительную подвижность, образуя шарнирную область, обеспечивающую смещение Fab-фрагментов и их вращение вокруг шарнира. Константные домены тяжелых цепей, как правило, гликозилированы, причем тип гликозилирования сильно варьирует у разных видов организмов и влияет на эффекторные функции иммуноглобулинов. Более того, даже антитела одного изоформа внутри одного вида организмов могут иметь гетерогенное гликозилирование.

Константная часть IgG содержит участки связывания с белком системы комплемента C1q и клеточными рецепторами Fc-фрагментов (FcγR), опосредствующими эффекторные (вторичные) функции иммуноглобулинов, т.е. их способность убивать клетки-мишени, запуская механизмы антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ; англ. ADCC – antibody dependent cellular cytotoxicity) и комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ; англ. CDC – complement-dependent cytotoxicity) (рис. 2). Способность иммуноглобулинов G и M связываться с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) играет важную роль в контроле уровня антител в сыворотке крови. Таким образом, при иммунном ответе организм вырабатывает слож-



Рис. 2. Схема взаимодействия ненагруженных антител с клеткой-мишенью. (1) Антитела способны вызывать апоптоз или остановку пролиферации клеток-мишеней, связываясь с мембранными антигенами на их поверхности (membrane raft mechanism) [6]. (2) Антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ). Киллерные клетки, несущие на поверхности рецепторы константных доменов IgG FcγR1 (CD16), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD64) (природные киллеры, киллеры, активированные лимфокинами, макрофаги, фагоциты) и рецепторы константных доменов IgE FcεR1 и FcεR2 (CD23) (эозинофилы) атакуют клетку-мишень, с поверхностными антигенами которой связались антитела. (3) Комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ). Парно сближенные антитела, связываясь с белковым комплексом C1q, вызывают каскад реакций системы комплемента, что приводит к разрушению мембраны. Отдельные продукты этого каскада реакций привлекают иммунные клетки или способствуют возникновению анафилактического шока

ный набор разнородных молекул, которые могут включать сразу несколько клеточных механизмов удаления чужеродного антигена и целый каскад биохимических реакций, предназначенных для этой цели.

Начало современной инженерии антител положила гибридная технология, предложенная Кёлером и Мильштейном в 1975 г. [7]. Этот метод заключается в слиянии (гибридизации) иммунных лимфоцитов (спленоцитов), синтезирующих антитела нужной специфичности, с бессмертной миеломной линией. Полученная в результате клеточная линия (гибридома) секретирует моноклональные антитела (мкАТ), т.е. антитела одного вида, специфичные к антигену, использованному для иммунизации. Культивирование гибридомы в культуре *in vitro* или выращивание ее в виде асцита у мышей позволяет иметь постоянный источник антител определенной специфичности. Слияние гибридом разной специфичности позволяет получать так называемые квадromы, продуцирующие наряду с исходными мкАТ моноклональные биспецифичные антитела, способные связываться с двумя разными антигенами.

Внедрение гибридной технологии определило колоссальный прогресс в использовании антител как для исследовательских, так и для практических целей (диагностика *in vitro*). Однако надежды на создание специфичных и высокоэффективных противоопухолевых препаратов на основе мкАТ и их конъюгатов с действующими агентами и быструю замену сывороточных вакцин препаратами мкАТ против патогенных микроорганизмов и их токсинов не оправдались. Далеким от оптимального было и применение мкАТ для доставки радиоактивных изотопов к клеткам-мишеням. Оказалось, что мкАТ имеют ряд особенностей, которые делают их применение в клинике неэффективным и опасным. На первых этапах индивидуальные мкАТ, полученные из пула гибридом, часто обладали значительно сниженной эффективностью взаимодействия с антигеном по сравнению с титром поликлональной антисыворотки. Это было обусловлено взаимодействием индивидуальных мкАТ с единственным эпитопом антигена, а также, возможно, частичной инактивацией антител в процессе их выделения. Полноразмерные мкАТ обладают неоптимальными фармакокинетическими свойствами при их использовании в качестве нацеливающих молекул. Мышиные мкАТ как чужеродные белки быстро подвергаются катаболизму, кроме того, они слабо взаимодействуют с неонатальным рецептором FcRn, отвечающим за рециркуляцию иммуноглобулинов из лизосом, что также ускоряет их вывод из кровотока. Наоборот, собственные полноразмерные антитела циркулируют по кровотоку до 2 недель. Из-за высокой молекулярной массы (150 кДа) иммуноглобулины медленно распределяются в организме, плохо проникают в ткани и не выводятся через почки. Ксеногенная природа мкАТ не позволяет задействовать систему комплемента и клеточные механизмы элиминации чужеродного антигена (АЗКЦ, КЗЦ) из-за плохого распознавания мышиных мкАТ Fc-рецепторами клеток иммунной системы человека. Высокая иммуногенность мышиных мкАТ для человека обусловила чрезвычайно опасную опасность их клинического применения из-за возникновения гипериммунных реакций. При использовании первого поколения иммунотоксинов были отмечены также

сильные побочные эффекты, связанные с природой присоединяемого токсина. Необходимо отметить, что даже достаточно успешно применяемые в клинике в настоящее время препараты мкАТ имеют опасные побочные эффекты (табл. 2).

В результате проб и ошибок был приобретен опыт и новое знание о механизмах взаимодействия антител с мишенями. Стало ясно, что для конкретных случаев клинического применения мкАТ необходимы их видоизменения, часто взаимно противоположные. Наибольший вклад в инженерию антител наряду с гибридной технологией внесли генная инженерия и технология трансгенных животных. Постараемся дать представление об основных направлениях инженерии антител для клинического применения. В настоящее время в мире принята американская система названий препаратов антител по USAN (US Adopted Names; www.ama-assn.org), которая представлена в табл. 3.

2. УКОРОЧЕННЫЕ ФРАГМЕНТЫ АНТИТЕЛ И АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ КАРКАСНЫЕ БЕЛКИ СО СПЕЦИФИЧЕСКИМ СВЯЗЫВАНИЕМ АНТИГЕНОВ

Первоначально наиболее привлекательным свойством антител в контексте конструирования «магической пули» было специфическое связывание с антигеном, которое должно обеспечивать доставку действующего агента (например, радиоактивного изотопа) к клетке-мишени. При этом решающими факторами, обеспечивающими эффективность этой доставки, являются аффинность и специфичность антитела по отношению к антигену и такие его физико-химические свойства, как валентность, поверхностный заряд и размер [8, 9].

Специфичность антитела, конструируемого для терапевтического применения, определяется выбором подходящей мишени. Разрешенные для клинического применения мкАТ направлены против 15 мишеней, большинство из которых является поверхностными клеточными антигенами, в т.ч. такими распространенными опухолевыми маркерами, как HER1, HER2/neu и PSMA (англ. prostate specific membrane antigen) (табл. 2). В течение последнего десятилетия достигнут огромный прогресс в понимании механизмов действия антител и в разработке новых мишеней для лечения онкологических, аутоиммунных, инфекционных, сердечно-сосудистых и др. заболеваний.

В недавних обзорах выделено пять групп потенциальных мишеней для антител, перспективных для терапии рака: раковые клетки внутри солидной опухоли – наименее поддающиеся терапии; диффузные злокачественные клетки (лейкемия); ассоциированная с опухолью строма (фибробласты); ассоциированные с опухолью кровеносные сосуды и факторы роста сосудов (сосудистый эндотелиальный фактор роста; англ. VEGF – vascular endothelial growth factor) [10, 11]. Дополнительные мишени могут возникать в ответ на блокирование поверхностных рецепторов [12] или специально индуцироваться на раковых клетках под воздействием лекарственного средства [13].

Аффинность антител, применяемых для терапии в настоящее время, лежит в пределах наномолярных концентраций (от 10^{-8} до 10^{-10} М), которые являются оптимальными для большинства задач. Было показано, что увеличение аф-

Табл. 3. Номенклатура терапевтических препаратов антител и их фрагментов по USAN (US Adopted Names; www.ama-assn.org)

Приставка	Вид заболевания или мишень	Источник происхождения антитела	Суффикс	Примеры
Подходящий слог(и), отличающийся от уже использованных.	vir - вирусное bac - бактериальное lim - иммунная система les - инфекционное cir - сердечно-сосудистое fung - грибковое ner - нервная система kin - интелликины mul - скелетно-мышечная система os - кости toxa - токсины anibi - ангиогенез Опухоли: col - толстой кишки mel - меланома mar - молочной железы got - семенника gov - яичника pro - простаты tum - разные	u - human (человек) o - mouse (мышь) a - rat (крыса) e - hamster (хомяк) i - primate (примат) axo - крыса/мышь xi - chimera (химерное) zu - humanized (гуманизированное) xizu - комбинация химерных и гуманизированных цепей	mab	
tras	tu	zu	mab	Trastuzumab (Herceptin®) – гуманизированное мкАТ против опухолей
ab	ci	xi	mab	Abciximab (ReoPro®) – химерное мкАТ для профилактики тромбоза артерий
r	anibi	zu	mab	Ranibizumab (Lucentis®) – гуманизированное мкАТ для блокирования ангиогенеза

Для того чтобы создать **новое обозначение**, необходимо:

- выбрать подходящий слог(и), отличающийся от уже использованных, и поставить его в начале слова;
- затем добавить слоги в следующем порядке: класс заболевания (вид опухоли) или мишень, источник происхождения, суффикс mab;
- для облегчения произношения последняя согласная в слог, обозначающем мишень, может быть опущена.

финности антитела до 10^{-11} М ухудшает его проникновение к опухоли и уменьшает селективность нацеливания [14].

Размер молекул терапевтического антитела является важным фактором, определяющим возможность их вывода через почки и, соответственно, быстроту выведения из организма. Время полувыведения белков через почки коррелирует с размером молекулы: порог клубочковой фильтрации оценивается в 60-65 кДа [15]. Тогда как полно-размерные молекулы IgG (~150 кДа) (рис. 1) слишком велики и не выводятся через почки, scFv-фрагменты (~30 кДа) (рис. 1), наоборот, имеют период полувыведения всего 0.5-2 ч и быстро покидают организм [16]. Промежуточное положение занимают мономерные Fab-фрагменты (48 кДа) с временем полувыведения 14-15.5 ч [16, 17].

Оптимальным поверхностным зарядом для терапевтических антител является интервал их изоэлектрических точек от 5 до 9. Увеличение как положительного, так и отрицательного заряда ухудшает связывание антитела с клетками-мишенями [18].

Валентность рекомбинантного антитела по отношению к антигену, на который оно нацелено, играет важную роль в удерживании мкАТ на клетках-мишенях. Большинство природных антител млекопитающих являются двухвалентными. Способность связывать одновременно два антигена значительно увеличивает функциональную аффинность, или авидность, иммуноглобулинов и обеспечивает длительное удерживание на клеточных поверхностных рецепторах и поливалентных антигенах. Это свойство используется в живой природе: тетра- и декавалентные комплексы антител классов А и М имеют повышенную

аффинность многоточечного связывания поливалентных антигенов и могут эффективнее выполнять свою защитную роль против таких природных поливалентных антигенов, как патогенные микроорганизмы.

Таким образом, применение антител в качестве нацеливающих компонентов для доставки диагностических и терапевтических агентов, в первую очередь радиоактивных изотопов, а также в качестве специфических блокаторов патогенных процессов требовало исключения эффекторных функций и кардинальной модификации их физико-химических свойств.

Первые укороченные фрагменты антител, мономерный Fab и димерный (Fab)₂ (рис. 1), предназначенные для использования в радиоиммунотерапии, были получены обработкой интактных IgG протеолитическими ферментами папаином или пепсином (рис. 1). Эти фрагменты лишены домена Fc, который опосредует эффекторные свойства IgG, нежелательные в данном случае, и не способны к рециркуляции из лизосом, что способствует снижению дозолимитирующей миелотоксичности и неспецифического радиоактивного фона по сравнению с полноразмерными IgG. При этом полученные фрагменты сохраняют антиген-связывающие свойства, сравнимые с таковыми родительских антител. Примерами терапевтического использования мономерного Fab-фрагмента являются антиагреганты ReoPro® (Abciximab) и его российский аналог Монафрам® [19], которые применяются в кардиохирургической практике для профилактики тромбозов, а также блокатор ангиогенеза Lucentis® (Ranibizumab), применяемый для лечения возрастной дегенерации сетчатки глаза (табл. 2). Благодаря

уменьшенному формату препарат Lucentis® (Ranibizumab), в отличие от полноразмерных антител, хорошо проникает через внутреннюю оболочку глаза, обуславливая возможность именно этого клинического применения [17]. Основными недостатками ферментного метода получения фрагментов антител являются определенная сложность очистки целевого продукта и возможность дальнейшей модификации физико-химических свойств антитела только путем химической модификации. Кроме того, первое поколение Fab-фрагментов имело мышинное происхождение и потому имело высокую иммуногенность.

Развитие методов генетической инженерии позволило упростить получение укороченных производных антител. Рекомбинантные антитела, т.н. одноцепочечные варибельные фрагменты, scFv (англ. single chain variable fragments) (рис. 1), кодируются одним геном и содержат только один антиген-связывающий участок, состоящий из варибельных доменов легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей, соединенных гибким пептидным линкером [20] (рис. 1). Эти scFv-фрагменты моновалентны и часто имеют сниженную аффинность по сравнению с исходной. Быстрое выведение из организма и гомогенная локализация на мишени делает их более пригодными для доставки радиоизотопов, чем родительские полноразмерные IgG. Другим очень важным преимуществом одноцепочечных антител является их совместимость с бактериальными системами экспрессии, уменьшенная иммуногенность и отсутствие эффекторных функций. Несмотря на это, моновалентные scFv-фрагменты не получили широкого терапевтического применения, поскольку даже высокоаффинное, но моновалентное связывание с антигеном на поверхности клеток не обеспечивает длительного удерживания антитела и приводит к его быстрой диссоциации.

Клонирование одноцепочечных антител с сохраненными антиген-связывающими функциями имело чрезвычайно важные последствия. С этого момента началось бурное развитие технологий создания неприродных антител практически любой специфичности. Были сконструированы разнообразные коллекции (библиотеки) рекомбинантных фрагментов антител, разработаны современные методы, увеличивающие их разнообразие, технологии, позволяющие увеличивать аффинность антител и эффективно отбирать нужные варианты [21, 22]. Разработаны селекционные платформы для иммуноглобулиновых библиотек на основе фагового, дрожжевого и рибосомного дисплея [23]. Перспективным источником антигенсвязывающих фрагментов с необычными свойствами стали неканонические антитела хрящевых рыб и животных рода Camelidae (верблюд, лама) (рис. 1), содержащие только тяжелые цепи. Антигенсвязывающий участок таких антител сформирован единственным варибельным доменом, который обладает хорошей растворимостью, высокой стабильностью и способностью связываться с труднодоступными антигенами [24, 25].

Параллельно началось интенсивное развитие молекулярных конструкций, альтернативных связывающим доменам антител, которые обозначаются в англоязычной литературе термином «scaffold». Этот термин вводится А. Плюктуном [26] для обозначения белкового остова или каркаса (framework), который может нести видоизменяемые (altered) аминокислотные остатки или небольшие последо-

вательности, придающие различным вариантам белка разные функции, обычно возможность эффективного связывания со специфичными мишенями. На русский язык слово scaffold переводится как «эшафот» или «(строительные) леса». Второе значение этого слова подходит по смыслу, но его трудно использовать в контексте белковой инженерии. Поэтому мы предлагаем использовать термин «каркасный белок» или «каркасный пептид» наряду с английской калькой «скафолд».

Типичными природными каркасными белками, или «скафолдами», являются антитела и Т-клеточные рецепторы. Существует множество других, природных и неприродных, каркасных белков, например аффибоды, пептабоды, анкириновые повторы, липокалины и др. [26]. Разработка альтернативных каркасных соединений – это перспективное направление для создания новых форматов соединений, специфически связывающихся с молекулярными и клеточными мишенями, предназначенных для биомедицинского применения и особенно подходящих для роботизированных технологий и конструирования супрамолекулярных наноструктур. Подтверждением этому является создание Европейской ассоциации ProteomeBinders с целью планомерного изучения протеома человека с помощью высокоаффинных реагентов [27].

3. ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Большое число теоретических и экспериментальных данных говорят о том, что самым простым способом преодолеть несовершенство рекомбинантных одноцепочечных Fv-фрагментов антител является возвращение к исходно присущему свойству антител – мультивалентности. Действительно, немало усилий приложено для конструирования мультимерных форматов укороченных антител с целью оптимизировать их фармакокинетические свойства и улучшить биораспределение доставляемых антителами действующих агентов. В настоящее время большое число таких конструкций проходит клинические испытания [28, 29].

За последнее десятилетие был разработан целый ряд подходов к инженерии мультивалентных антител, подробно описанных в нашем обзоре [9]. Валентность сконструированных мультивалентных производных, т.е. число связывающих антиген единиц может варьировать от 2 до 10. Предложенные стратегии основаны на химической конъюгации фрагментов антител, использовании самоассоциирующихся пептидов и феномена перестановки доменов при смешивании двух антител разной специфичности. Бивалентные тандемные и биспецифические антитела получают линейным слиянием генов. Более универсальный характер имеет применение гетеродимеризационных модулей, в т.ч. стрептавидин-биотиновой системы, модуля барназа:барстар [30, 31], метода «застежки-кнопки» [32] и «замка на причале» [33, 34] и др. Каждая стратегия имеет свои преимущества и недостатки, но ни одна не является универсальной. Систематизация и сравнительный анализ экспериментальных данных по фармакокинетике мультивалентных производных антител разного формата, направленных к раковым маркерам HER2/neu, SEA и маркеру ангиогенеза ED-B-домену фибронектина, показали,

что в большинстве случаев наблюдается существенное улучшение фармакокинетических характеристик и биораспределения при переходе от моновалентного к бивалентному (мультивалентному) формату антитела [9].

Еще одним важным способом варьировать фармакокинетические характеристики мкАТ является тонкая сайт-специфическая модификация константного домена в зависимости от конкретного применения конструируемого иммуноглобулина. Неонатальный или, как его еще называют, спасательный (англ. salvage) рецептор Fc (FcRn) выполняет в организме важные функции: отвечает за перенос IgG через эпителиальный и эндотелиальный барьеры, в частности, за передачу иммуноглобулинов от матери ребенку, и обеспечивает защиту IgG и альбумина от катаболизма в лизосомах эндотелия сосудов [35]. FcRn обладает высоким сродством к IgG при pH 6.0 и не связывается с ним при pH 7.2. Таким образом, механизм защиты IgG

от катаболизма основан на связывании FcRn с антителами в лизосомах при pH 6.0 и возврате их в кровотоки [36]. Направленный мутагенез Fc-фрагмента позволяет получать варианты антител, произвольно изменяя время их полужизни в кровотоке [37]. Путем замены ключевых аминокислотных остатков в участках константного домена мышиных противораковых антител, вовлеченных во взаимодействие с FcRn, был получен ряд мутантов с временем полужизни от 8 до 80 ч в организме мыши, тогда как этот показатель для антител дикого типа составляет ~12 дней [38]. Такие антитела быстро выводятся из организма, что крайне важно при радиоиммунотерапии, и улучшают разрешение при скитинграфии. Наоборот, мутантные антитела с повышенной аффинностью связывания с FcRn при pH 6.0 обладают более длительным временем полужизни в организме [39]. Увеличение времени циркуляции важно при использовании терапевтических антител для лечения

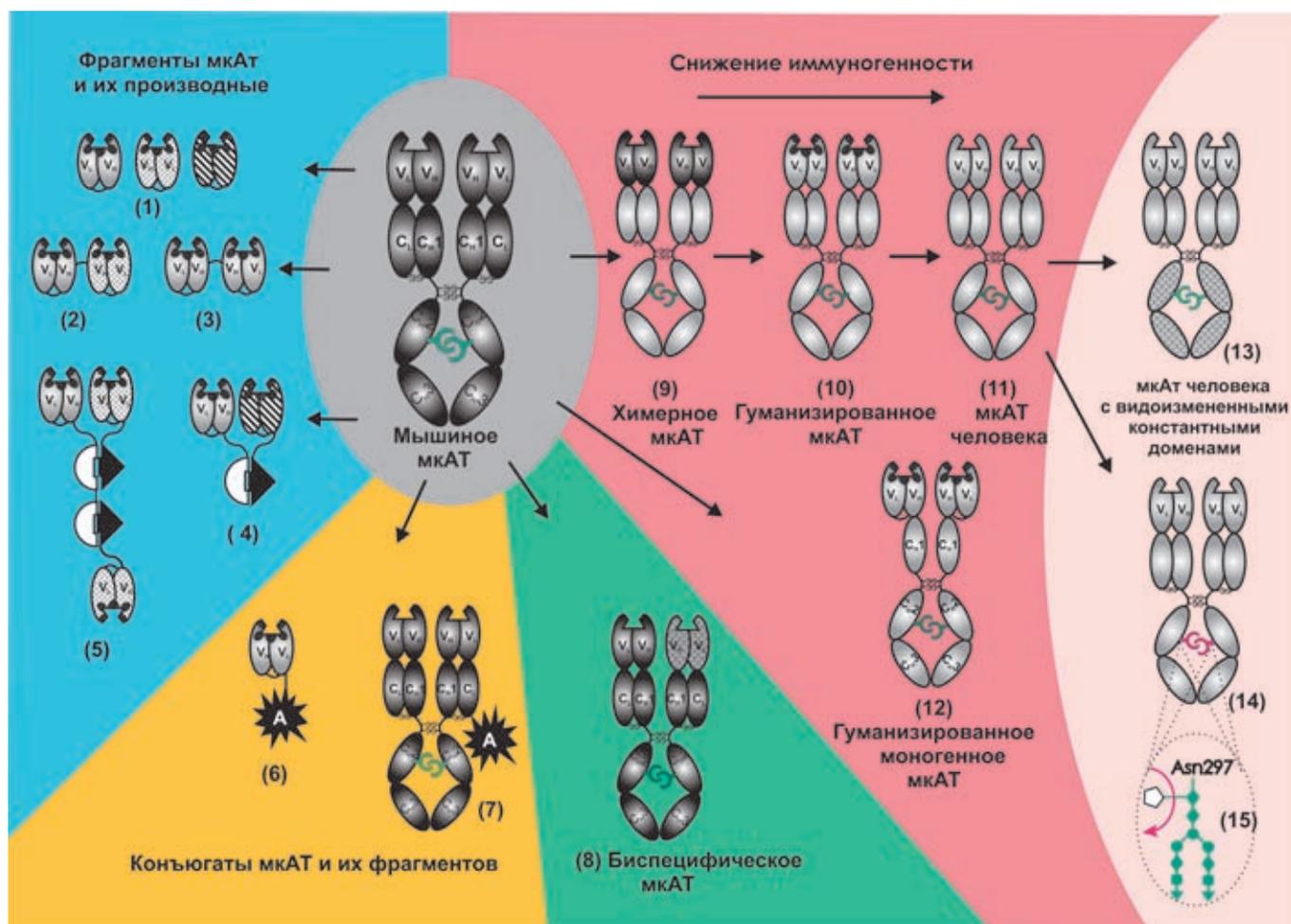


Рис. 3. Основные направления модификации мышиных моноклональных антител (мкАТ) для клинического применения. Показаны фрагменты мкАТ, полученные генно-инженерными методами, в т.ч.: (1) – одноцепочечные антитела (scFv или мини-антитела) разной специфичности, состоящие из VL- и VH-доменов, связанных пептидным линкером; (2) – биспецифическое мини-антитело; (3) – димерное мини-антитело; (4) и (5) – димер и тример мини-антитела, связанные с помощью модуля барназа:барстар; (6) – конъюгат мини-антитела с биоактивным агентом, полученный генно-инженерным способом; (13) – мкАТ человека с видоизмененными константными доменами; (14) – мкАТ человека с видоизмененным углеводным компонентом (15). Условные обозначения антител и их фрагментов, как на рис. 1: черным цветом обозначены гипервариабельные районы вариабельных доменов (CDR), темно-серым – мышиные антитела и фрагменты, светло-серым – человеческие, штриховкой – вариабельные домены разной специфичности (1-5) и модифицированные константные домены (13). Белый полукруг и черный треугольник – барназа и барстар соответственно. А – биоактивный агент (радиоактивный изотоп, токсин, фермент, флуоресцентный белок и т.д.)

инфекционных заболеваний или нейтрализующих антител для лечения острых отравлений. Например, введение тройной мутации M252Y/S254T/T256E в константный домен мкАТ, специфичных к респираторному синцитиальному вирусу, увеличило в 10 раз их связывание при pH 6.0 с FcRn человека и макака-крабеда (*Macaca fascicularis*). В то же время мутантные мкАТ легко отделялись от антител при pH 7.4. Исследование фармакокинетических свойств мутантных мкАТ на модели примата показало, что как время их полужизни в кровотоке, так и накопление в легких увеличились в 4 раза [40]. Интересно отметить, что мутагенез аминокислотных остатков константного домена, отвечающих за связывание с FcRn, в большинстве случаев не затрагивал других эффекторных свойств антитела. Таким образом, направленное изменение FcRn-связывающих участков является перспективным методом для управления фармакокинетическими свойствами мкАТ, конструируемых для различных применений. Кроме того, создание пептидных антагонистов, блокирующих рецептор FcRn, может быть использовано для снижения уровня патогенных IgG в организме, что является еще одним подходом для лечения аутоиммунных заболеваний [41].

Альтернативным способом улучшения фармакокинетики и биораспределения производных мини-антител является присоединение к ним полиэтиленгликоля [42] и альбумина [43], что увеличивает молекулярную массу соединения и, соответственно, замедляет экскрецию через почки. Не исключено, что в случае альбумина привлекается дополнительно механизм рециркуляции, опосредованный неонатальным рецептором [44].

4. УМЕНЬШЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ (ГУМАНИЗИРОВАНИЕ)

Одной из первых проблем, возникших при создании антител для клинического применения, являлась сильная иммуногенность мкАТ ксеногенного для человека происхождения. Иммунный ответ на введение мышинных мкАТ (НАМА-response – human anti-mouse antibodies response) приводит к серьезным системным реакциям организма человека вплоть до анафилактического шока (табл. 2). Применение методов генетической инженерии позволило частично заменить иммуногенные участки мышинных мкАТ на соответствующие фрагменты антител человека. В **химерных** мкАТ [45] (рис. 3) все константные домены обеих цепей антитела мыши заменены на константные домены иммуноглобулина человека, в **гуманизированных** мкАТ (рис. 3) только гипервариабельные участки, отвечающие за комплементарное взаимодействие с антигеном (CDR), имеют мышинное происхождение. С помощью генно-инженерных методов получают также моногенные конструкции гуманизированных антител [46]. В настоящее время полностью мышинные антитела применяются в небольших дозах только для радиоиммунотерапии в связи с необходимостью быстрого вывода их из кровотока (см. препараты Vexhar® и Zevalin® в табл. 2).

Более сложные технологии разработаны для получения полностью **человеческих** мкАТ (рис. 3). Методы скрининга scFv или Fab-фрагментов антител нужной специфичности из комбинаторных библиотек (фаговый, рибосомный, дрожжевой дисплей) с последующей реконструкцией из них

полноразмерных иммуноглобулинов человека не требуют предварительной иммунизации. Так, широко применяемый для терапии аутоиммунных заболеваний препарат Adalimumab (Humira®) изначально был получен как scFv-фрагмент с помощью Cambridge Antibody Technology (MedImmune), а затем восстановлен в целое антитело [47]. Полностью **человеческие** мкАТ получают также в трансгенных мышцах с экспрессирующимися генами иммуноглобулинов человека. Технология заключается в замене локусов генов IgG мыши на соответствующие участки генома человека. Примером является терапевтический препарат Panitumumab (Vectibix®), специфичный к EGFR, сконструированный с помощью технологии HuMouse (фирма Abgenix).

В настоящее время эта область продолжает активно развиваться, и все множество подходов, применяемых для гуманизирования антител, можно условно разделить на рациональные и эмпирические [48]. Рациональные методы включают т.н. цикл дизайна: генерирование небольшого числа вариантов, основанных на информации о структуре антитела и его гена, затем их анализ и выбор наилучшего варианта. К ним относятся: прививка гипервариабельных участков мкАТ мыши, отвечающих за комплементарность взаимодействия (CDR-grafting), или только их небольшой части (20–30%), отвечающей за специфичность (SDR-grafting), на каркас иммуноглобулина человека [49]; ремоделирование поверхности мкАТ мыши с целью сделать ее максимально подобной поверхности иммуноглобулина человека (resurfacing); супергуманизация на основе выявления и удаления из молекулы иммуноглобулина мыши потенциальных эпитопов для главного комплекса гистосовместимости и Т-клеток (human string content optimization) [50]. В последнее время внимание исследователей привлекают однодоменные антитела верблюда (наноантитела) (рис. 1), которые обладают высокой стабильностью, технологичностью и способностью связывать труднодоступные антигены. Для клинического применения таких наноантител была разработана общая стратегия их гуманизирования [51]. Были выявлены аминокислотные остатки, определяющие различия наноантител и соответствующего им вариабельного домена тяжелой цепи IgG человека. Затем из репрезентативной библиотеки выделили наноантитела, которые путем точной «доводки», т.е. последовательной замены отдельных участков молекулы, были максимально приближены по своей структуре к соответствующему домену иммуноглобулина человека, т.е. гуманизированы. При этом наноантитела не потеряли своей стабильности и сохранили исходную аффинность.

В противоположность рациональным методам эмпирические методы гуманизирования антител основаны на создании больших комбинаторных библиотек [21, 22] и селекции требуемых вариантов с помощью технологий обогащения, таких как, например, фаговый, рибосомный или дрожжевой дисплей, или с помощью технологии высокопроизводительного скрининга [23]. Эти методы в большинстве своем применимы к одноцепочечным антителам (scFv), которые при необходимости могут быть превращены в моногенное мкАТ [46] (рис. 3, 8) путем слияния с константным доменом Fc и димеризации, а также реконструированы в полноразмерное антитело канонического строения.

Как правило, оба подхода дополняют друг друга. В настоящее время около 40 гуманизированных и человеческих мкАТ, полученных с помощью новых методов селекции для противораковой терапии, проходят последние стадии клинических испытаний [47]. Гуманизирование терапевтических антител не только привело к ослаблению опасных побочных эффектов, но позволило также более полно использовать мощный потенциал мкАТ, т.е. задействовать их эффекторные функции.

5. ОПТИМИЗАЦИЯ ЭФФЕКТОРНЫХ ФУНКЦИЙ АНТИТЕЛ

Антитела, связавшиеся с поверхностью клетки-мишени, могут вызывать ее гибель посредством запуска механизмов АЗКЦ и КЗЦ (см. выше), рис. 2. Далеко не для всех клинических применений мкАТ эти механизмы могут быть полезны. Например, для направленной доставки радиоиммуноизотопов или блокирования отторжения трансплантата эффекторные функции мкАТ не нужны, более того, они могут вызвать опасные осложнения. В других случаях, наоборот, действие мкАТ может быть усилено за счет привлечения клеток-киллеров. Одним из первых подходов такого рода было создание биспецифических мкАТ, дополнительно привлекающих к клеткам мишеням цитотоксические Т-лимфоциты (см. раздел 6). Кроме того, за последние годы был выявлен целый ряд рецепторов иммунных клеток, отвечающих за взаимодействие с антителами, и выяснена роль отдельных участков IgG в этом взаимодействии. Так, в недавних исследованиях было показано, что эффективность терапевтического антитела зависит от его аффинности к FcγRIIIa (CD16) и FcγRIIa (CD32), характерным активирующим рецепторам целого ряда клеток-киллеров. Оказалось, что ответ пациента на лечение препаратами мкАТ зависит от его фенотипа. Было показано, что фенотипы пациентов FcγRIIIa-158 V/V и FcγRIIa-131 H/H являются хорошим прогностическим признаком при лечении больных фолликулярной и неходжкинской лимфомой препаратом Rituxan® (Rituximab) [52]. Аналогичные результаты получены при лечении рака молочной железы препаратом мкАТ Herceptin® (Trastuzumab) [53]. С другой стороны, терапевтическое антитело может связываться с рецепторами FcR на нетоксичных клетках (тромбоциты, В-клетки), которые способны ингибировать активацию эффекторных клеток-киллеров (например, рецептор FcγRIIb на макрофагах). Действительно, было показано, что ингибиторная изоформа FcγRII ухудшает терапевтический эффект гуманизированного препарата Herceptin® (Trastuzumab) на модельных животных [54]. Приведенные данные свидетельствуют о том, что на современном этапе инженерии антител для увеличения эффективности терапевтического антитела необходимо проводить оптимизацию его эффекторных функций в зависимости от особенностей применения.

В этом контексте следует также упомянуть конструкции, в которых константная часть иммуноглобулина используется в сочетании с нацеливающими пептидами вместо антигенсвязывающих участков IgG [55] или с цитокинами в мономерном и димерном форматах для улучшения фармакокинетики и защиты от деградации [56].

Существует несколько путей оптимизации эффекторных функций антител. Для того чтобы полностью от-

ключить эти функции, используют различные варианты укороченных антител, лишенных константных доменов, отвечающих за связывание с компонентом системы комплемента C1q и клетками-киллерами (см. раздел 3). Примерами укороченных антител являются антиагреганты ReoPro® (Abciximab), Монафрам®, а также блокатор ангиогенеза Lucentis® (Ranibizumab) (табл. 2). Другим способом является переключение субкласса антител с IgG1 на IgG2, как у противоракового препарата Vectibix® (Panitumumab), специфичного к маркеру EGFR (HER1)[57] (табл. 2). Константный домен IgG2 практически не связывается с рецепторами FcγR клеток-киллеров, поэтому антитела этого субкласса не способны вызвать АЗКЦ.

Более универсальный подход предполагает направленный мутагенез участков связывания константных доменов с C1q и клеточными рецепторами FcγR. Направленный мутагенез стал возможен благодаря точному картированию участков связывания FcγR на константных доменах IgG1 [58]. Был получен весь спектр мутантных мкАТ от практически несвязывающихся с FcγR и C1q и потому неспособных вызвать АЗКЦ и КЗЦ до высокоаффинных мкАТ, вызывающих весь набор реакций по этим двум механизмам [59-61.] Были получены также варианты мкАТ, не способные связываться с C1q и потому не вызывающие каскад реакций комплемента, но сохранившие высокую аффинность связывания с рецепторами FcγR и способность вызывать АЗКЦ [50]. Важным результатом этой работы стало получение мутантных мкАТ (S239D/I332E/A330L), способных хорошо связываться не только с менее распространенным гомозиготным аллелем FcγRIII-158V/V (20 % больных), но и с более распространенными аллелями FcγRIII-158V/F (45 % больных) и FcγRIII-158F/F (35 % больных). Конструирование терапевтических антител с эффекторными функциями, не зависящими от полиморфизма пациентов, открывает путь к распространению успеха лечения такими препаратами, как Herceptin® (Trastuzumab) и Rituxan® (Rituximab).

Углеводный компонент составляет всего 3 % от общей массы IgG (рис. 1), но, несмотря на малое процентное содержание, играет важную роль в осуществлении эффекторных функций антитела. IgG содержит две разветвленные олигосахаридные цепи, каждая из которых через атом азота присоединена к остатку Asn297 в CH2-домене константной части (рис. 3). Состав углеводного компонента иммуноглобулинов имеет высокую видоспецифичность, а также варьирует внутри вида. Гликозилирование неприродных (или сконструированных) антител зависит от системы, в которой они получены, выбранного клона, системы выделения. Поэтому «неправильное» гликозилирование терапевтических антител, полученных в ксеногенных системах (см. раздел 8), может вызывать у человека иммунный ответ, аллергические реакции, а также способствовать быстрому выведению этих антител из кровотока [62]. Известно также, что олигосахариды (гликаны) в составе IgG являются ключевыми компонентами для оптимального связывания константной части IgG с рецепторами FcγR, опосредствующими эффекторные функции. Недавно было показано, что удаление фукозы из углеводного компонента антитела более чем в 50 раз усиливает АКЗЦ [63]. Снижение эффективности антител в организме по сравнению

с опытами *in vitro*, заставляющее повышать концентрации вводимого препарата, связано с ингибирующим эффектом фукозилированных иммуноглобулинов плазмы крови [64]. Нефукозилированные терапевтические антитела обладают большей аффинностью к рецепторам FcγR по сравнению с фукозилированными, что позволяет им противостоять ингибирующему эффекту IgG, циркулирующих в плазме, и проявлять свое действие при меньших концентрациях [65].

Все терапевтические антитела, допущенные к применению в клинике, производятся в настоящее время в клетках CHO, миеломных клетках мыши NS0 и SP2/0 и мышечных гибридомах. Почти все из них имеют фукозилированный углеводный компонент и, как следствие, АКЗЦ, далекую от оптимальной [66]. Фукозилирование углеводного компонента IgG осуществляется в клетках млекопитающих ферментом α-1,6-фукозилтрансферазой (FUT8). Некоторые мышечные клеточные линии имеют сниженный по сравнению с клетками CHO уровень этого фермента. Однако наиболее эффективным способом удаления фукозы является необратимая инактивация гена FUT8. Так были сконструированы клеточные линии CHO с нокаутированным геном FUT8, позволяющие получать нефукозилированные терапевтические антитела с АКЗЦ, увеличенной в 50–100 раз [67]. Прояснение роли углеводного компонента IgG дало мощный импульс новому направлению в инженерии антител, и в настоящее время технологии конструирования антител, затрагивающие углеводный компонент, интенсивно развиваются [68]. Это направление представляется одним из самых обещающих для конструирования следующего поколения терапевтических антител с улучшенными свойствами.

6. БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА

Природные антитела моноспецифичны, т.е. связываются с антигеном только одного вида. Технологии инженерии антител позволяют создавать для разных клинических применений биспецифические антитела (рис. 3, 2, 4, 5, 8), объединяя в одной молекуле специфичность к двум разным антигенам [29, 69]. Первые биспецифичные антитела были получены путем слияния двух гибридных клеточных линий. Полученная в результате квадромы продуцирует случайную смесь целевого биспецифического антитела и исходных антител и требует последующего сложного выделения нужного варианта. Несколько подходов были предложены для увеличения выхода биспецифических молекул, в т.ч. получение межвидовой квадромы мышь-крыса с преимущественным спариванием легкой и тяжелой цепей из одного вида [70], а также изящная технология «застежки-кнопки» (англ. «knob-and-holes») [32]. В СНЗ-домены мкАТ были введены два вида мутаций: «кнопка» – с заменой небольшого аминокислотного остатка (треонин) на объемный (тирозин) и «гнездо для кнопки» – с противоположной заменой. В результате слияния гибридов, производящих два вида антител, преимущественно образовывались биспецифические молекулы, которые могли зашелкнуться с помощью «застежки-кнопки». Распространенным методом получения биспецифических антител до сих пор остается химическая конъюгация [71], несмотря на такие недостатки, как необходимость химических моди-

фикаций, не всегда безвредных для соединяемых антител, и проблема разделения получившихся вариантов.

Методы генной инженерии позволяют получать биспецифические мкАТ и их фрагменты, обходя проблему разделения сложной смеси продуктов [9]. Для этого традиционно используют стрептавидин-биотиновую систему, имеющую самую высокую прочность комплекса с константой диссоциации компонентов $K_D \cdot 10^{-15}$ М. Мы предложили использовать в качестве гетеродимеризационного модуля белковую пару барназа:барстар (рис. 3, 4, 5), которая практически не уступает стрептавидин-биотиновой системе по прочности комплекса с $K_D \cdot 10^{-14}$ М, но позволяет получать биспецифические антитела с точным соотношением 1:1 или 1:2 (тример) и не требует химической модификации компонентов [72], что очень важно для таких тонко устроенных белков, как антитела. Недавно для создания биспецифических антител разработан красивый метод «замка на причале» (англ. «dock and lock» – DNL-method) [33] (см. также раздел 7). Хорошие фармакокинетические характеристики и двухвалентное связывание с поверхностным антигеном делают полученные этим методом антитела перспективными агентами для радиоиммунотерапии. В то же время недостатком этого метода является относительно невысокая аффинность комплекса ($K_D \sim 10^{-9}$), что требует его дополнительной стабилизации дисульфидными связями.

Первоначально биспецифические антитела использовались для перенацеливания цитотоксических иммунных клеток на патологические мишени. Было создано множество биспецифических антител, один узнающий домен которых связывался с каким-либо характерным поверхностным маркером раковой клетки, а другой – с активирующим рецептором цитотоксических клеток [69, 73]. В качестве таких рецепторов, привлекающих цитотоксические клетки к мишени, были испробованы рецептор IgG FcγRI (CD64), характерный для моноцитов, макрофагов и дендритных клеток, и рецептор IgA FcαRI (CD89), экспрессирующийся преимущественно на нейтрофилах, макрофагах и эозинофилах, а также маркер CD3 цитотоксических Т-лимфоцитов. Стоит отметить, что Т-лимфоциты, одни из самых мощных киллерных клеток, не могут быть привлечены антителами, так как лишены рецепторов Fcγ. К сожалению, клинические испытания выявили неэффективность такого подхода. Иммунные клетки требовали дополнительной активации, эффект проявлялся при 40–100-кратном превышении фактора над числом клеток-мишеней и высокой дозе препарата, наблюдалась высокая дозозимитирующая токсичность препаратов [73, 74]. Использование биспецифических антител для привлечения к раковым мишеням цитотоксических Т-клеток посредством связывания с CD3 давало эффект только при местном применении [75] или при адаптивном переносе Т-клеток, обработанных биспецифическими антителами *ex vivo* [76].

Почти все эти ограничения удалось преодолеть с помощью нового поколения антител формата ViTE (англ. **V**ispecific **T**-cell **E**ngager), которые представляют собой рекомбинантные биспецифические одноцепочечные антитела, состоящие из двух scFv-фрагментов, специфичных к поверхностному антигену клетки-мишени и Т-клеточному антигену CD3. В отличие от вышеупомянутых полноразмерных биспецифических мкАТ, антитела ViTE не требу-

ют дополнительной активации привлекаемых иммунных клеток и обладают цитотоксичностью при гораздо меньших концентрациях [77, 78]. Очевидно, что биспецифичные мкАТ, перенацеливающие иммунные клетки, – это перспективное направление, особенно для лечения раковых заболеваний крови: клинические исследования показали, что препарат Blinatumomab (анти-CD19/анти-CD3) в концентрации 0.005 мг/м²/день приводит к полной элиминации раковых В-лимфоцитов из кровотока у больных неходжкинской лимфомой [79].

Аналогичные подходы с применением биспецифических антител были использованы для перенацеливания стволовых клеток, вирусов и патогенов. Так, для привлечения стволовых клеток в миокард модельного животного при инфаркте и для восстановления васкуляризации предложено использовать биспецифические антитела, узнающие рецептор стволовых клеток CD45, и антигены, которые становятся доступными при поражении миокарда [71]. Такой подход позволяет доставить к месту поражения гораздо большее число клеток, чем при инъекции суспензии стволовых клеток непосредственно в миокард. Биспецифические антитела пробовали применять также для направленной доставки к опухоли аденовирусов с целью генотерапии [80] и для удаления патогенов из кровотока посредством их

перенацеливания на рецептор комплемента CR1 на эритроцитах [81]. Исследования такого рода еще предстоит довести до клинических испытаний.

Вторая большая область клинического применения биспецифических антител – это предварительное нацеливание (англ. pre-targeting) с последующей направленной доставкой токсинов, химиотерапевтических агентов и радиоактивных изотопов к раковым клеткам (рис. 4). Идея предварительного нацеливания на мишень с последующим ее поражением «по наводке» порождена желанием максимально снизить общий токсический эффект при использовании сильных токсинов или радионуклидов как за счет меньшего времени циркуляции в крови, так и за счет снижения терапевтической концентрации токсина. Для этого на первом этапе в организм вводятся антитела, нацеленные на поражаемую мишень, например, опухоль, а затем после естественного выведения несвязавшихся с мишенью антител вводят второй, цитотоксический, компонент (токсин, радионуклид), специфически связывающийся с введенными антителами (рис. 4). Вначале было предложено использовать для предварительного нацеливания немеченые биспецифические антитела, связывающиеся одной валентностью с опухолевым антигеном, а другой – с гаптеном, несущим радиоактивный изотоп [82]. Недостатком

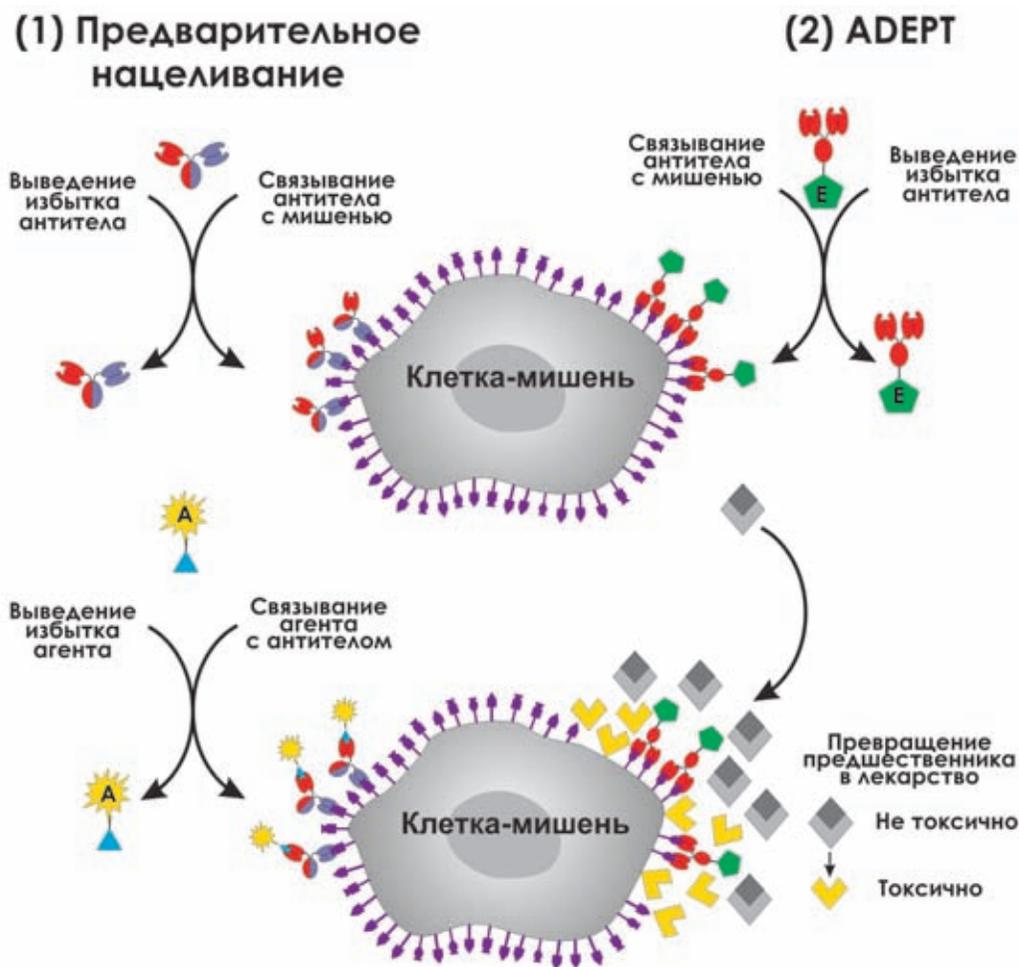


Рис. 4. Схема двухстадийной технологии поражения мишеней. (1) Предварительное нацеливание (англ. pre-targeting) с помощью антител с последующим поражением мишени привлеченным агентом А. (2) Предварительная доставка к мишени специального фермента Е, который на второй стадии превращает неактивный предшественник лекарственного средства в активную форму – ADEPT (англ. – Anti-body-Directed, Enzyme Pro-drug Therapy)

метода является одновалентное, а значит, неоптимальное связывание с антигеном, а также относительно низкий выход биспецифических антител, получаемых из клеток миеломной линии. Методы генетической инженерии позволили сконструировать для радиоиммунотерапии целый ряд укороченных фрагментов антител, в т.ч. в мультивалентном формате (см. разделы 1, 2 и 7), что позволило значительно улучшить фармакокинетические характеристики нацеливающих антител, а также специфичность и разрешение метода [83].

Третье направление, требующее конструирования биспецифических антител – это одновременное связывание двух разных антигенных детерминант на одной мишени. Высокая плотность поверхностного антигена на клетках-мишенях по сравнению с другими, непатогенными клетками – это непереносимое условие использования этого антигена для нацеливания, обеспечивающее специфичность воздействия на мишень и безопасность для целого организма. Часто число молекул на клеточной поверхности недостаточно велико. В этом случае одним из способов увеличить специфичность нацеливания на раковую клетку и время удерживания антител на мишени является конструирование биспецифических антител, одновременно связывающихся с двумя разными опухоль-ассоциированными антигенами, экспрессированными на одной и той же раковой клетке [72, 84]. Этот подход важен еще и потому, что дополнительные поверхностные антигены могут возникать в процессе лечения в ответ на блокирование рецепторов EGFR или HER2/neu и обуславливать резистентность к таким лекарственным препаратам, как Trastuzumab, Cetuximab и Panitumumab. Недавно было показано, что одним из механизмов резистентности может быть избыточное присутствие других тирозинкиназных рецепторов (IGF-RI, c-MET, Ron и др.), запускающих те же сигнальные пути, что EGFR и HER2/neu, в обход заблокированных рецепторов [85]. Применение биспецифических антител для одновременного блокирования EGFR и IGF-1R значительно усилило ответ раковых клеток по сравнению с воздействием антител только одного вида [12]. Такое комбинированное воздействие сразу на несколько поверхностных антигенов может блокировать избыточные сигнальные пути в раковой клетке и приводить к более благоприятному клиническому результату. Суммарный эффект производят также биспецифические антитела в формате «внутренних антител» (англ. intrabody), специфичных к рецепторам ангиогенеза VEGF-R2 и Tie-2. Одновременное блокирование двух путей ангиогенеза с помощью таких антител значительно усиливает ингибирование ангиогенеза и роста опухоли по сравнению с блокированием лишь одного пути [86].

7. ИММУНОКОНЬЮГАТЫ

Стремление реализовать идею «магической пули» и недостаточная эффективность «ненагруженных» антител по отношению к мишеням побудили исследователей к конъюгированию антител с другими эффекторными молекулами (рис. 3): радиоизотопами, токсинами, интерлейкинами, ферментами, активирующими лекарственные препараты и т.д.). В таких иммуноконъюгатах антитела обычно выступают в качестве нацеливающего компонента, доставляющего к мишени действующий (цитотокси-

ческий) или диагностический агент. Для присоединения низкомолекулярных агентов, например, радиоизотопов или низкомолекулярных флуоресцентных красителей, традиционно используют химические методы конъюгации [11, 87]. Для улучшения проникновения радиоиммуноконъюгатов в опухоль к антителам генно-инженерным способом присоединяют функционально активные пептиды (CPP – cell-penetrating peptides), способные не только проникать через мембрану, но и переносить другие белки внутрь клетки. Среди них наиболее эффективны пептиды, представляющий собой олигопептид (43-58 а.о.) из гомеодомена белка Antp дрозофилы, и TAT – олигопептид (49-57 а.о.) из трансаktиватора транскрипции ВИЧ. Показано, что радиоиммуноконъюгаты на основе мини-антител, специфичных к опухолевому антигену TAG72, снабженные пептидом или олигопептидом TAT, в 2,5-3 раза лучше накапливаются в опухоли ксенографтных мышей [88].

В онкологической практике приняты для применения два препарата для радиоиммунотерапии неходжкинской лимфомы: Vexxar[®], представляющий собой IgG2a мыши, конъюгированный с бета-эмиттером средней энергии ¹³¹I (радиус проникновения 1 мм) и Zevalin[®] – IgG1 мыши, конъюгированный с бета-эмиттером высокой энергии ⁹⁰Y (радиус проникновения 11 мм) (табл. 2). В настоящее время активно ведутся работы для замены мышиных антител в качестве нацеливающих агентов для радиоиммунотерапии на менее иммуногенные фрагменты (см. раздел 3), а также разрабатываются технологии предварительного нацеливания (pre-targeting) для снижения общей радиационной нагрузки на организм (см. раздел 6).

В этом случае, так же как и для создания биспецифических антител, необходим гетеродимеризационный модуль. В настоящее время для этой цели применяют стрептавидин-биотиновую систему [89], хорошо себя зарекомендовавшую для целого ряда аналитических приложений. Однако ее применение в организме человека ограничено присутствием большого количества эндогенного биотина, который может конкурировать с биотинилированными компонентами. Нами предложена новая стратегия двухстадийной доставки, основанная на рибонуклеазе барназе и ее природном ингибиторе, барстаре [30, 31]. Как упоминалось выше, эти два маленьких белка (110 и 89 а.о.) образуют комплекс ($K_D \sim 10^{-14}$ М), сравнимый по прочности со стрептавидин-биотиновой системой [90]. Они стабильны, хорошо растворимы и устойчивы к протеазам, что делает их совместимыми с бактериальной системой экспрессии. N- и C-концы обоих белков расположены вне области их взаимодействия и доступны для генно-инженерного слияния с нацеливающими мини-антителами и цитотоксическими агентами [91, 92]. Принципиальная возможность двухстадийной доставки действующего агента к раковым клеткам показана на примере рекомбинантных мини-антител, специфичных к раковому поверхностному антигену HER2/neu и слитых с барстаром, и визуализирующего компонента – рекомбинантного флуоресцентного белка EGFP, слитого с барназой [31]. Важными преимуществами модуля барназа:барстар являются точное соотношение 1:1 компонентов в комплексе и полное отсутствие их самоагрегации, а также высокая аффинность взаимодействия, превосходящая значения всех других димеризационных систем,

за исключением стрептавидин-биотиновой. Но, в отличие от стрептавидин-биотиновой системы, использование гетеродимеризационного модуля барназа:барстар основано на генно-инженерных технологиях и не требует никаких ковалентных модификаций.

Из других методов, разрабатываемых для предварительного нацеливания на мишень, большой интерес представляет метод «замка на причале» (англ. «dock and lock» – DNL-method) [33]. Эта технология основана на специфическом белок-белковом взаимодействии димерной регуляторной субъединицы RII цАМФ-зависимой протеинкиназы и заякоривающего домена (амфипатическая спираль из 14-18 а.о.) якорного белка киназы А. На основе этих полипептидов и Fab-фрагментов двух разных антител сконструировано трехвалентное биспецифическое антитело, узнающее опухолевый антиген СЕА (карциноэмбрионный антиген) и гаптен гистамин-сукцинил-глицин. На первом этапе направленной доставки (рис. 4) «причаливающий» компонент обеспечивает двухвалентное взаимодействие с опухолевым антигеном, на втором этапе «замок», соединенный заякоривающим доменом с «причалом», связывается с гаптенем, меченным радиоактивным ^{99m}Tc . Относительно невысокая аффинность комплекса ($K_D \sim 10^{-9}$) требует его дополнительной стабилизации дисульфидными связями. К недостаткам следует также отнести сложность конструкции трехвалентного антитела – для сборки комплекса требуется пять видов белковых цепей. Несмотря на эти трудности, предварительное нацеливание позволило в ~25 раз увеличить накопление радиоактивной метки на привитых опухолях у мышей по сравнению с одностадийным введением [33]. В настоящее время этот метод претендует на то, чтобы заменить традиционно применяемые для предварительного нацеливания биспецифические мкАТ и стрептавидин-биотиновую систему [89]. Действительно, для этого приложения трехвалентные биспецифические антитела, полученные методом «замка на причале» имеют ряд неоспоримых преимуществ: двухвалентное связывание с опухолевым антигеном, что усиливает взаимодействие и увеличивает время удерживания на патогенных клетках; отсутствие эффекторных функций антитела, что значительно уменьшает нежелательные побочные действия; быстрое выведение из организма нацеливающего компонента, что уменьшает время ожидания второго этапа – введения собственно радиоактивного изотопа – с 6-7 дней до нескольких часов [93].

Большое число исследований посвящено использованию мощных токсинов различной природы для направленного воздействия на клетки мишени, 44 % препаратов противоопухолевых антител, проходящих клинические испытания, являются иммуноконъюгатами или рекомбинантными белками. При этом лишь один препарат, Mylotarg[®], представляющий собой гуманизированное анти-CD33-антитело Gentuzumab, химически конъюгированное с цитотоксическим антибиотиком калихеамицином, принят для клинического применения (табл. 2). Такая диспропорция отражает объективные трудности, с которыми встретились исследователи при разработке этой привлекательной идеи. Для иммунотоксинов, сконструированных на основе бактериальных токсинов или антибиотика доксорубина, на первых этапах исследований была характерна высокая

системная токсичность и большое число побочных эффектов. Применение антител, нагруженных мощными токсинами, требует гораздо более внимательного подхода к выбору мишени, поскольку необходимо полностью избежать доставки цитотоксических агентов к нормальным клеткам. Предпочтительно нацеливать иммунотоксины на антигены, не экспрессирующиеся на нормальных клетках, но с очень высоким уровнем экспрессии на поверхности опухолевых клеток. Несвязавшийся иммунотоксин должен быстро выводиться из кровотока. Желательным является быстрая интернализация антигена после связывания с иммунотоксином. Кроме того, поскольку эффективность лекарства напрямую связана с уровнем токсичности соединения, целесообразно применять токсины с уровнем IC_{50} , лежащим в пределах нано- и пиколярных концентраций. В арсенале исследователей на сегодняшний день это ауристатины, мейтанзиноиды, калихеамицины и белковые токсины: рицин, псевдомонадный и дифтерийный токсины [94].

Все эти представления приняты во внимание при конструировании препарата Mylotarg[®] (табл. 2). Поверхностный антиген CD33, к которому специфично гуманизированное мкАТ Gentuzumab, гиперэкспрессируется на поверхности злокачественных клеток при острой миелоидной лейкемии, поэтому максимальная доза препарата, при которой еще не проявляется токсичность, довольно высока – 9 мг/м². CD33 быстро интернализуется, и терапевтический ответ зависит не от уровня экспрессии антигена, а от стадии клеточного цикла и уровня множественной устойчивости к лекарствам (multi-drug resistance). Цитотоксический компонент этого иммунотоксина – антибиотик калихеамицин, который связывается с малой бороздкой ДНК и вносит в нее разрывы. Токсичность этого антибиотика характеризуется величиной IC_{50} в пределах низкой нМ концентрации.

Цитотоксичность антибиотиков группы ауристатинов и мейтанзиноидов имеет другую природу. Они связываются с α -тубулином и нарушают полимеризацию микротрубочек, что приводит к остановке клеточного цикла и клеточной смерти. В качестве мишеней для иммуноконъюгатов используют клеточные маркеры CD20, CD30, CD70, PSMA (prostate specific membrane antigen), HER2/neu, E-селектин и LewisY. Так же как и в случае радиоиммунотерапии, иммуноконъюгаты имеют больший эффект при лечении гематологических видов рака и не эффективны для лечения солидных опухолей.

В настоящее время клинические испытания проходят также иммунотоксины на основе укороченного псевдомонадного экзотоксина А и дифтерийного токсина. Механизм их действия основан на каталитическом АДФ-рибозилировании фактора 2, ингибирующего трансляцию. Первое и второе поколение этих мультидоменных белков обладало чрезвычайной системной токсичностью, которая была значительно снижена после удаления доменов, отвечающих за связывание с клетками. Преимуществом этих белков является их сильная токсичность в пМ концентрациях – чтобы убить клетку, требуется всего несколько молекул. Недостатком является иммуногенность и наличие побочного эффекта – синдрома повышенной проницаемости сосудов. Для преодоления иммуногенности в группе одного из пионеров исследований по иммунотоксинам А.

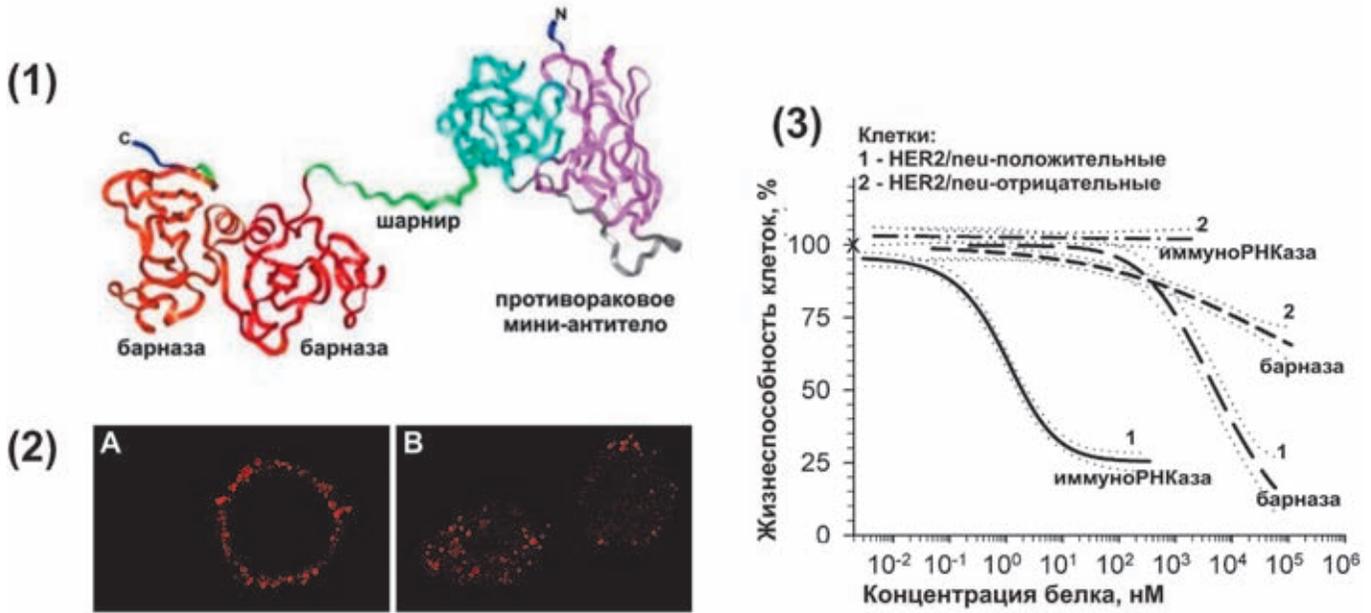


Рис. 5. Иммунодбарназа – перспективный агент для терапии опухолевых новообразований [105]. (1) Схема структуры иммунодбарназы. (2) Взаимодействие иммунодбарназы с клетками, экспрессирующими раковый маркер HER2/неу: поверхностное связывание при 4 °С (а) и интернализация при 37 °С (б). (3) Цитотоксичность иммунодбарназы для клеток с гиперэкспрессией ракового маркера HER2/неу

Пастана была проведена скрупулезная работа по деиммунизации укороченного псевдомонадного экзотоксина PE38 с полным сохранением токсичности [95]. Высокая интенсивность работ по созданию лекарственных препаратов на основе иммунотоксинов позволяет надеяться на их скорое поступление в распоряжение врачей.

Попытки использования РНКаз в качестве токсинов начались гораздо позже, в конце 1990-х гг. Были получены конъюгаты бычьей панкреатической РНКазы и мышечных антител против EGFR [96] и рекомбинантный белок на основе человеческой панкреатической РНКазы и одноцепочечных мини-антител к трансферриновому рецептору [97]. Для снижения иммуногенности человеческая панкреатическая РНКаза была слита с гуманизированным мини-антителом [98]. Эти же авторы впервые предложили термин иммуноРНКаза. Сегодня наблюдается взрыв интереса к иммуноРНКазам [99-102]. РНКазы привлекают исследователей своей доступностью, низкой иммуногенностью и отсутствием токсичности вне клетки. Это позволяет надеяться на отсутствие системной токсичности препаратов на основе РНКаз, но добавляет проблему интернализации в клетки-мишени. Применение РНКаз человеческого происхождения значительно лимитировано ингибированием их природным ингибитором (RI), присутствующим в клетках. Путем направленного мутагенеза были получены мутанты человеческой РНКазы, устойчивые к ингибитору [103], а также продолжен поиск подходящих РНКаз другого происхождения [104]. В настоящее время успешно завершаются клинические испытания онконазы – первой РНКазы, примененной для терапии рака [105]. Это небольшой положительно заряженный белок (104 а.о.) лягушки принадлежит к суперсемейству рибонуклеаз А амфибий

и оказывает цитостатическое и цитотоксическое действие преимущественно на раковые клетки. Такая избирательность, вероятно, связана с сильным положительным зарядом онконазы и быстрым метаболизмом раковых клеток [105].

В нашей лаборатории для создания иммунотоксина использована бактериальная рибонуклеаза барназа [30, 45, 106, 107]. Этот небольшой, устойчивый и хорошо растворимый белок нечувствителен к природному ингибитору РНКаз человека. Ранее мы показали, что в составе мультидоменных рекомбинантных белков барназа играет роль внутреннего шаперона, обеспечивает правильное сворачивание отдельных доменов, способствует устойчивости и хорошей растворимости всего белка [108]. Барназа токсична для клеток и была использована нами для создания вектора с «нулевым» фоном [90]. Сконструированная нами иммунодбарназа содержит две молекулы барназы и гуманизированное мини-антитело, специфичное к интернализирующемуся раковому маркеру HER2/неу (рис. 5, 1). В экспериментах *in vitro* показано, что оснащение токсического агента барназы адресующим мини-антителом существенно увеличивает эффективность ее воздействия на раковые клетки. Противораковое миниантитело не только доставляет барназу на поверхность раковых клеток (рис. 5, 2а), но и обеспечивает ее проникновение внутрь клетки (рис. 5, 2б), где она проявляет свое токсическое действие. Иммунодбарназа в концентрации 1.8 нМ вызывает апоптоз 50 % HER2/неу-положительных клеток, тогда как для подобного воздействия на HER2/неу-отрицательные клетки требуется концентрация в 250-300 раз больше (рис. 5, 3). Цитотоксический эффект барназы, лишенной адресующего мини-антитела, неспецифичен и в ~1000 раз меньше, чем

цитотоксический эффект иммунодибарназы (рис. 5, 3) [107]. Специфичность воздействия на раковые клетки и низкая действующая концентрация иммунодибарназы свидетельствуют о ее перспективности в качестве агента для терапии опухолевых новообразований.

РНКаза, циркулирующая в кровяном русле, нетоксична для организма и приобретает цитотоксичность, лишь проникнув в раковую клетку, являясь, в определенном смысле, предшественником токсина (англ. pro-toxin) [99]. Аналогичная идея создания неактивного предшественника лекарства, которое можно доставить к мишени и там превратить в активную форму, разрабатывается в различных вариантах технологии ADEPT (англ. **Antibody-Directed, Enzyme Pro-drug Therapy**) (рис. 4). Технология основана на предварительной направленной доставке фермента, конъюгированного с антителом, к клеткам-мишеням. Направленная доставка обеспечивается специфичностью антител к клеточному антигену. На следующем этапе вводится неактивный предшественник лекарства, который лишь в микроокружении мишени конвертируется ранее доставленным ферментом в активную форму и убивает близлежащие клетки. В качестве ферментов в этом подходе используют β -лактамазу, карбоксипептидазу G2 и др. [86, 109, 110].

Создание антиидиотипических антител с определенными каталитическими функциями – абзимов, которые одновременно обладают как функциями антитела, так и ферментативной активностью, является новым перспективным направлением. Модификации scFv-фрагментов таких антител в сочетании с применением фаговых библиотек позволяют отбирать абзимы с заранее заданными свойствами [111, 112].

Некоторые цитокины, например IL-2, IL-12, TNF α , IFN γ , GM-CSF, обладают иммуномодулирующим и противоопухолевым действием. К сожалению, непосредственное использование этих белков в качестве лекарств вряд ли возможно из-за их высокой системной токсичности в действующих концентрациях, быстрого распада и выведения из организма, а также из-за ненаправленного и неспецифического воздействия на опухолевые клетки. Создание конъюгатов антител с цитокинами – иммуноцитокинов – позволяет преодолевать указанные ограничения. Наиболее продвинулись исследования терапевтических и адъювантных свойств интерлейкина-2. Например, обнадеживающие результаты получены при клинических испытаниях рекомбинантных иммуноцитокинов, сконструированных на основе интерлейкина-2 и гуманизированных антител к раковому маркеру (дисиалоганглиозид GD2, epithelial cell adhesion molecule EpCAM) и к маркеру ангиогенеза (EDB – extra domain B of fibronectin) – для лечения меланомы, нейробластомы и неходжкинской лимфомы [113, 114], а также интерлейкина-2, слитого с антителами к клеточному маркеру CD20, для лечения злокачественных В-клеточных лейкозов [115]. Применение иммуноцитокинов способствует также усилению терапевтических эффектов при химиотерапии [116].

Конъюгаты антител с различными флуоресцентными метками широко применяются в иммунологии для исследований *in vitro*. Введение в молекулярную биологию такого мощного инструмента, как флуоресцентные белки (Нобелевская премия 2008 г. – Dr. Osamu Shimomura, Dr. Martin

Chalfie, Dr. Roger Y. Tsien), позволяет в реальном времени следить за процессами в живых клетках. Исследователи из Японии создали систему для визуализации живых раковых клеток непосредственно в организме, основанную на pH-активируемом флуоресцентном агенте, направляемом в клетку-мишень с помощью противоракового интернализирующегося антитела [117]. Флуоресценция наблюдается лишь при попадании агента в лизосомы живой раковой клетки и исчезает при ее гибели. Специфичность метода составила 99 %. Это исследование пока еще далеко от клинического применения, но свидетельствует о новых возможностях иммуноглобулиновых конъюгатов.

8. СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ

Производство стабильных и высокоаффинных мкАТ в достаточных количествах для предклинических и клинических исследований является на сегодняшний день узким местом для широкого применения этого класса терапевтических соединений. Быстро возрастающий спрос на антитела и на их качество привел к развитию огромного числа разнообразных систем для продукции антител и их фрагментов на основе грам-положительных (*Bacillus*) и грам-отрицательных (*Escherichia*) бактерий, дрожжей, нитчатых грибов, клеточных линий насекомых и млекопитающих [118–120]. Высокотехнологичные системы, такие как бактериальные и дрожжевые продуценты, позволяющие наращивать биомассу в ферментерах и получать рекомбинантные белки с высоким выходом, хорошо совместимы с задачами наработки укороченных фрагментов мкАТ, негликозилированных Fab-фрагментов и scFv, как правило, снабженных специальными концевыми пептидами для быстрого выделения на аффинных сорбентах. В последнее время антитела стали получать в трансгенных растениях и животных, которые особенно подходят для наработки полноразмерных антител [72, 121]. В то же время для быстрой наработки и селекции полноразмерных антител создана система экспрессии на поверхности бактериальных клеток (т.н. «Е-клонированные» антитела; англ. «E-clonal» antibodies), применимая для полноразмерного и дивалентного формата [122]. Характер гликозилирования антител в дрожжах, растениях, насекомых отличается от гликозилирования, видоспецифичного для человека, и поэтому антитела, полученные в таких системах, применимы только для экспериментальных исследований. В настоящее время антитела для клинического применения производят в трансгенных мышах, у которых иммуноглобулиновые локусы инактивированы и заменены генами иммуноглобулинов человека [10, 123]. Наиболее известны трансгенные линии мышей Xenomouse (Abgenix; www.abgenix.com); HuMab mouse (GenPharm; www.genpharm.ca); TC mouse and KM mouse (Kirin Brewery Company; www.medarex.com). Для мкАТ, полученных в таких продуцентах, значительно снижен риск высокой иммуногенности препаратов, обусловленный ксеногенными посттрансляционными модификациями, в первую очередь, особенностями гликозилирования. Наряду с этим, разрабатываются новые технологии, позволяющие получать мкАТ с человеческим профилем гликозилирования в дрожжах, насекомых и трансгенных растениях [124, 125].

9. ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

В начале этого века, через столетие после присуждения Нобелевской премии основоположникам современной теории иммунитета Илье Мечникову и Паулю Эрлиху (1908 г.), произошел качественный скачок в познании тонких молекулярных механизмов функционирования антител и их взаимодействия с защитными системами организма. Он обусловлен резко возросшими возможностями инструментального обеспечения экспериментальных научных исследований, накоплением и систематизацией большого количества информации. Успехи биоинформатики позволяют проводить моделирование соединений с заранее заданными свойствами, а революционный прогресс в технологиях генетической и клеточной инженерии – создавать биотехнологические продуценты терапевтических препаратов.

Современные технологии позволяют видоизменять свойства антител в зависимости от их предназначения и привлекать все их функции. С помощью генно-инженерных подходов исследователям удается разбирать антитела на составные части и собирать из них нужные конструкции. Укороченный формат антител, сфокусированный на функции связывания с мишенью, совместимый с бактериальной экспрессией, используется для получения широкого набора соединений, предназначенных для высокоэффективной доставки действующих агентов. Созданы клонотехники иммуноглобулиновых фрагментов и высокоэффективные системы их скрининга. Наряду с этим развилось целое направление конструирования альтернативных антителам каркасных молекул, скафолдов, обладающих аналогичной способностью специфического связывания. Это область безусловно будет развиваться как в направлении конструирования нового поколения рекомбинантных укороченных гуманизированных антител с мультивалентным связыванием, обладающих улучшенными фармакокинетическими характеристиками [34, 126], так и в направлении альтернативных каркасных конструкций [127]. Широкое применение укороченные антитела, лишённые константных доменов, находят в радиоиммунотерапии для направленной доставки радиоактивных изотопов, как компоненты иммунотоксичных для онкологии, как специфические блокаторы мишеней в кардиохирургии и др.

Огромный потенциал имеют биспецифические антитела как в укороченном, так и в полноразмерном формате. В радиоиммунотерапии они применяются уже довольно давно, и новые технологии позволяют лишь модифицировать и улучшить существующие и хорошо себя зарекомендовавшие методы одно- и двухстадийной доставки радиоизотопов к мишени [93]. Напротив, успешное применение биспецифических антител в области клеточной иммунотерапии только начинается [128], и здесь открывается широкое поле для экспериментальных и клинических исследований. Высокая изменчивость раковых клеток и проблема их резистентности к терапии вызывает необходимость комплексного лечения и применения сразу нескольких препаратов с разным механизмом действия. Здесь также незаменимы

биспецифические антитела, одновременно поражающие две мишени или блокирующие два метаболических пути.

Более новым и бурно развивающимся направлением являются технологии, позволяющие управлять функциями константного домена антител. Развитие инженерии константного домена и, в частности, инженерии углеводного компонента мкАТ означает возвращение «на круги своя» и возрождение интереса именно к эффекторным функциям антитела и к полноразмерному формату мкАТ для привлечения в патологический очаг всех защитных систем самого организма [129].

Одним из направлений, очень перспективным в технологическом отношении, является создание гибридных биосовместимых наночастиц из материалов органического и неорганического происхождения. Оснащение таких наночастиц фрагментами антител будет обеспечивать высокоточное нацеливание, а доставленные с их помощью полупроводниковые флуоресцентные кристаллы («квантовые точки»), магнитные наночастицы, коллоидное золото, производные фуллеренов и др., с одной стороны, будут служить носителями лекарственных соединений, с другой – позволят осуществлять дополнительное внешнее воздействие на мишени с помощью лазерного, акустического, СВЧ и других видов электромагнитного излучения [130, 131]. Это новое поколение мультифункциональных наноконструкций должно обладать совокупностью свойств, которые трудно или нельзя использовать по отдельности. Такое комбинированное воздействие на опухоли позволит реализовать принцип «целое больше, чем сумма составляющих его частей».

В настоящее время из 266 применяющихся лекарственных мишеней, найденных в геноме человека, только 15 используются в качестве антигенов при конструировании терапевтических антител для лечения различных заболеваний, и почти все они являются поверхностными клеточными антигенами [132]. Накопление знаний о биологии рака позволит выявлять новые клеточные цели и направленно создавать мультифункциональные конструкции для точного воздействия на мишени, отвечающие за пролиферацию, адгезию, метаболизм, распространение и другие механизмы злокачественных новообразований [133]. Можно предполагать, что будущий успех клинического применения антител будет в большой степени определяться разработкой новых мишеней для них по мере накопления новых знаний о механизмах и молекулярных участниках патологических процессов. ●

Работы лаборатории С. М. Деева по инженерии антител поддержаны грантом РФФИ № 09-04-01201-а, ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы», программами Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов».

Список литературы

1. Erhlich P. In: *Physiology or medicine 1901-1921*. Elsevier Publishing Co., Amsterdam; 1967. P. 304-320.
2. Desmyter A., Decanniere K., Muyldermans S., et al. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 26285-26290.
3. San Paulo A., Garcia R. // *Biophys. J.* 2000. V. 78. P. 1599-1605.
4. Saltzman W.M., Radomsky M.L., Whaley K.J., et al. // *Biophys. J.* 1994. V. 66. P. 508-515.
5. Choi H.S., Liu W., Misra P., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 1165-1170.
6. Mone A.P., Cheney C., Banks A.L., et al. // *Leukemia*. 2006. V. 20. P. 272-279.
7. K hler G., Milstein C. // *Nature*. 1975. V. 256. P. 495-497.
8. Beckman R.A., Weiner L.M., Davis H.M. // *Cancer*. 2007. V. 109. P. 170-179.
9. Deyev S.M., Lebedenko E.N. // *BioEssays*. 2008. V. 30. P. 904-918.
10. Adams G.P., Weiner L.M. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 1147-1157.
11. Sharkey R.M., Goldenberg D.M. // *CA Cancer J. Clin.* 2006. V. 56. P. 226-243.
12. Lu D., Zhang H. Ludwig D., et al. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 2856-65.
13. Rubinfeld B., Upadhyay A., Clark S.L., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 205-209.
14. Adams G.P., Schier R., McCall A.M., et al. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 4750-4755.
15. Trejtnar F., Laznicek M. // *Q. J. Nucl. Med.* 2002. V. 46. P. 181-194.
16. Covell D.G., Barbet J., Holton O.D., et al. // *Cancer Res.* 1986. V. 46. P. 3969-3978.
17. Gaudreault J., Fei D., Rusit J., et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1986. V. 46. P. 726-733.
18. Melkko S., Halin C., Borsi L., et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2002. V. 54. P. 1485-1490.
19. Мазуров А.В., Певзнер Д.В., Староверов И.И., и др. // *Кардиология*. 2005. Т. 5. С. 4-12.
20. Bird R.E., Hardman K.D., Jacobson J.W., et al. // *Science*. 1986. V. 242. P. 423-426.
21. Benhar I. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2007. V. 7. P. 763-779.
22. Mondon P., Souvris N., Douchy L., et al. // *Biotechnol.* 2007. V. 2. P. 76-82.
23. Hoogenboom H.R. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 1105-1116.
24. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., et al. // *Nature*. 1993. V. 363. P. 446-448.
25. Greenberg A.S., Avila D., Hughes M., et al. // *Nature*. 1995. V. 374. P. 168-73.
26. Binz H.K., Amstutz P., Plückthun A. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 1257-1268.
27. Taussig M.J., Stoevesandt O., Borrebaeck C.A., et al. // *Nat. Methods*. 2007. V. 4. P. 13-17.
28. Holliger P., Hudson P.J. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 1126-1136.
29. Jain M., Kamal N., Batra S.K. // *Trends Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 307-316.
30. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 1486-1492.
31. Лебеденко Е.Н., Баландин Т.Г., Эдельвейс Э.Ф., и др. // *ДАН (Биохимия, Биофизика, Молекулярная биология)*. 2007. Т. 414. С. 120-123.
32. Ridgway J.B., Presta L.G., Carter P. // *Protein Eng.* 1996. V. 9. P. 617-621.
33. Rossi E.A., Goldenberg D.M., Cardillo T.M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 6841-6846.
34. Rossi E.A., Goldenberg D.M., Cardillo T.M., et al. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. P. 8384-8392.
35. He W., Ladinsky M.S., Huey-Tubman K.E., et al. // *Nature*. 2008. V. 455. P. 542-546.
36. Lencer W.I., Blumberg R.S. // *Trends Cell. Biol.* 2005. V. 15. P. 5-9.
37. Roopenian D.C., Akillesh S. // *Nat. Rev. Immunol.* 2007. V. 7. P. 715-725.
38. Kenanova V., Olafsen T., Crow D.M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 18709-18714.
39. Hinton P.R., Johlfs M.G., Xiong J.M., et al. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 6213-6216.
40. Dall'Acqua W.F., Kiener P.A., Wu H. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 23514-23524.
41. Mezo A.R., McDonnell K.A., Hehir C.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 2337-2342.
42. Kubetzko S., Balic E., Waibel R., et al. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 35186-351201.
43. Tijink B.M., Laeremans T., Budde M., et al. // *Mol. Cancer Ther.* 2008. V. 7. P. 2288-2297.
44. Anderson C.L., Chaudhury C., Kim J., et al. // *Trends Immunol.* 2006. V. 27. P. 343-348.
45. Deyev S.M., Lieber A., Radko B.V., et al. // *FEBS Lett.* 1993. V. 330. P. 111-113.
46. Деев С.М., Стремковский О.А., Лукаш С.В., и др. // *ДАН (Биохимия, Биофизика, Молекулярная биология)*. 2006. Т. 406. № 6. С. 829-831.
47. Deonarin M.P. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2008. V. 8. P. 1123-1141.
48. Almagro J.C., Fransson J. // *Front. Biosci.* 2008. V. 13. P. 1619-1633.
49. Kashmiri S.V., De Pascalis R., Gonzales N.R., et al. // *Methods*. 2005. V. 36. P. 25-34.
50. Lazar G.A., Desjarlais J.R., Jacinto J., et al. // *Mol. Immunol.* 2006. V. 44. P. 1986-1998.
51. Vincke C., Loris R., Saerens D., et al. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 3273-3284.
52. Weng W.K., Levy R. // *J. Clin. Oncol.* 2003. V. 21. P. 3940-3947.
53. Musolino A., Naldi N., Bortesi B., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2008. V. 26. P. 1789-1796.
54. Clynes R.A., Towers T.L., Presta L.G., et al. // *Nat. Med.* 2000. V. 6. P. 443-446.
55. Matsuda Y., Okitsu A., Sato S., et al. // *Neurosci. Lett.* 1996. V. 205. P. 87-90.
56. Jazayeri J.A., Carroll G.J. // 2008. V. 22. P. 11-26.
57. Zhu Z. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2007. V. 28. P. 1476-1493.
58. Shields R.L., Namenuk A.K., Hong K., et al. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 6591-6604.
59. Lazar G.A., Dang W., Karki S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 4005-4010.
60. Baudino L., Shinohara Y., Nimmerjahn F., et al. // *J. Immunol.* 2008. V. 181. P. 6664-6669.
61. Horton H.M., Bennett M.J., Pong E., et al. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. P. 8049-8057.
62. Beck A., Wagner-Rousset E., Bussat M.C., et al. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008. V. 9. P. 482-501.
63. Shields R.L., Lai J., Keck R., et al. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 26733-26740.
64. Preitner S., Elm S., Lippold S., et al. // *Mol. Immunol.* 2006. V. 43. P. 1183-1193.
65. Iida S., Misaka H., Inoue M., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2006. V. 12. P. 2879-2887.
66. Kamoda S., Nomura C., Kinoshita M., et al. // *J. Chromatogr. A*. 2004. V. 1050. P. 211-216.
67. Yamane-Ohnuki N., Kinoshita S., Inoue-Urakubo M., et al. // 2004. V. 87. P. 614-622.
68. Satoh M., Iida S., Shitara K. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2006. V. 6. P. 1161-73.
69. Kontermann R.E. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2005. V. 26. P. 1-9.
70. Lindhofer H., Mocikat R., Steipe B., et al. // *J. Immunol.* 1995. V. 155. P. 219-225.
71. Lee R.J., Fang Q., Davol P.A., et al. // *Stem Cells*. 2007. V. 25. P. 712-717.
72. Semenyuk E.G., Stremovskiy O.A., Edelweiss E.F., et al. // *Biochimie*. 2007. V. 89. P. 31-38.
73. Kufer P., Lutterbüse R., Baeuerle P.A. // *Trends Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 238-244.
74. Müller D., Kontermann R.E. // *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2007. V. 9. P. 319-326.
75. Marmé A., Strauss G., Bastert G., et al. // *Int. J. Cancer*. 2002. V. 101. P. 183-189.
76. Chan J.K., Hamilton C.A., Cheung M.K., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2006. V. 12. P. 1859-1867.
77. Löffler A., Kufer P., Lutterbüse R., et al. // *Blood*. 2000. V. 95. P. 2098-2103.
78. Baeuerle P.A., Kufer P., Bargou R. // 2009. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2009. V. 11. P. 22-30.
79. Bargou R., Leo E., Zugmaier G., et al. // *Science*. 2008. V. 321. P. 974-977.
80. Nettelbeck D.M., Rivera A.A., Kupsch J., et al. // *Int. J. Cancer*. 2004. V. 108. P. 136-145.
81. Reinagel M.L., Taylor R.P. // *J. Immunol.* 2000. V. 164. P. 1977-1985.
82. Chang C.H., Sharkey R.M., Rossi E.A., et al. // *Mol. Cancer Ther.* 2002. V. 1. P. 553-563.
83. Goldenberg D.M., Chatal J.F., Barbet J., et al. // *Update Cancer Ther.* 2007. V. 2. P. 19-31.
84. Dorvillius M., Garambois V., Pourquier D., et al. // *Tumour Biol.* 2002. V. 23. P. 337-347.
85. Jaim E.R., Summy J., Bauer T.W. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. P. 397-405.
86. Jendreyko N., Popkov M., Rader C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 8293-8298.
87. Wu A.M., Senter P.D. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 1137-1146.
88. Jain M., Chauhan S.C., Singh A.P., et al. // *Cancer Res.* 2005. V. 65. P. 7840-7846.
89. Sharkey R.M., Karacay H., Cardillo T.M., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. P. 7109-7121.
90. Deyev S.M., Yazynin S.A., Kuznetsov D.A., et al. // *Mol. Gen. Genet.* 1998. V. 259. P. 379-382.
91. Тимофеев В.П., Баландин Т.Г., Ткачев Я.В., и др. // *Биохимия*. 2007. Т. 72. С. 1220-1230.
92. Timofeev V.P., Novikov V.V., Tkachev Y.V., et al. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2008. V. 25. P. 525-534.
93. Goldenberg D.M., Rossi E.A., Sharkey R.M., et al. // *J. Nucl. Med.* 2008. V. 49. P. 158-63.
94. Pastan I., Hassan R., FitzGerald D.J., et al. // *Annu. Rev. Med.* 2007. V. 58. P. 221-237.
95. Onda M., Nagata S., FitzGerald D.J., et al. // *J. Immunol.* 2006. V. 177. P. 8822-8834.
96. Suwa T., Ueda M., Jinno H., et al. // *Anticancer Res.* 1999. V. 19. P. 4161-4165.
97. Zewe M., Rybak S.M., Dübel S., et al. // *Immunotechnology*. 1997. V. 3. P. 127-36.
98. De Lorenzo C., Arciello A., Cozzolino R., et al. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 4870-4874.
99. De Lorenzo C., D'Alessio G. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008. V. 9. P. 210-214.
100. Lee J.E., Raines R.T. // *BioDrugs*. 2008. V. 22. P. 53-58.
101. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. // *Bioessays*. 2008. V. 30. P. 781-790.
102. Schirrmann T., Krauss J., Arndt M.A., et al. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2009. V. 9. P. 79-95.
103. Rutkoski T.J., Raines R.T. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008. V. 9. P. 185-189.
104. Krauss J., Arndt M.A., Vu B.K., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 331. P. 595-602.
105. Ardel W., Shogen K., Darzynkiewicz Z. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008. V. 9. P. 215-25.
106. Glinka E.M., Edelweiss E.F., Sapozhnikov A.M., et al. // *Gene*. 2006. V. 366. P. 97-103.
107. Edelweiss E., Balandin T.G., Ivanova J.L., et al. // *PLoS ONE*. 2008. V. 3. P. e2434.
108. Martsev S.P., Tsybovsky Y.I., Stremovskiy O.A., et al. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2004. V. 17. P. 85-93.
109. Bagshawe K.D. // *Expert Rev. Anticancer. Ther.* 2006. V. 6. P. 1421-1431.
110. Bagshawe K.D. // *Curr. Drug Targets*. 2009. V. 10. P. 152-157.
111. Gabibov A.G., Ponomarenko N.A., Tretyak E.B., et al. // *Autoimmun. Rev.* 2006. V. 5. P. 324-330.
112. Reshetnyak A.V., Armentano M.F., Ponomarenko N.A., et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 16175-16182.
113. Johnson E.E., Lum H.D., Rakhmilevich A.L., et al. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2008. V. 57. P. 1891-1902.
114. Wagner K., Schulz P., Scholz A., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2008. V. 14. P. 4951-4960.
115. Lyng H., Serrano L.M., Pfeiffer T., et al. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. P. 2872-2880.
116. Lyu M.A., Kurzrock R., Rosenblum M.G. // *Biochem Pharmacol.* 2007. V. 75. P. 836-846.
117. Urano Y., Asanuma D., Hama Y., et al. // *Nat. Med.* 2009. V. 15. P. 104-109.
118. Powers D.B., Amersdorfer P., Poul M., et al. // *J. Immunol. Methods*. 2001. V. 251. P. 123-135.
119. Schirrmann T., Al-Halabi L., Dübel S., et al. // *Front. Biosci.* 2008. V. 13. P. 4576-4594.
120. Wurm F.M. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 1393-1398.
121. Lico C., Chen Q., Santi L. // *J. Cell Physiol.* 2008. V. 216. P. 366-377.
122. Mazor Y., Van Blarcom T., Mabry R., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 563-565.
123. Weiner L.M. // *Nat. Rev. Cancer*. 2007. V. 7. P. 701-706.
124. Li H., Sethuraman N., Stadheim T.A., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 210-215.
125. Cox K.M., Sterling J.D., Regan J.T., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 1591-1597.
126. Kügler M., Stein C., Schwenkert M., et al. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2009. V. 22. P. 135-147.
127. Steiner D., Forrer P., Plückthun A. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. P. 1211-1227.
128. d'Argoues S., Wissing S., Brandl C., et al. // *Leuk. Res.* 2009. V. 33. P. 465-473.
129. Weiner L.M. // *Nat. Rev. Cancer*. 2007. V. 7. P. 701-706.
130. Natarajan A., Gruettner C., Ivkov R., et al. // *Bioconjug Chem.* 2008. V. 19. P. 1211-1218.
131. Yang L., Mao H., Wang Y.A., et al. // *Small*. 2009. V. 5. P. 235-243.
132. Overington J.P., Al-Lazikani B., Hopkins A.L. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006. V. 5. P. 993-996.
133. Binyamin L., Alpaugh R.K., Hughes T.L., et al. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. P. 6392-6401.