

УДК 577.27

Рекомбинантный иммунотоксин 4D5scFv-PE40 для таргетной терапии HER2-положительных опухолей

Е. А. Соколова^{1,2}, О. А. Стрёмовский², Т. А. Здобнова¹, И. В. Балалаева^{1*}, С. М. Деев^{1,2}¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: irin-b@mail.ru

Поступила в редакцию 21.08.2015

РЕФЕРАТ Рекомбинантные иммунотоксины представляются исключительно перспективными соединениями с точки зрения развития таргетного лечения опухолей с определенным молекулярным профилем. В работе исследованы свойства нового рекомбинантного иммунотоксина, специфичного к онкомаркеру HER2, полученного на основе антитела формата scFv и фрагмента PE40 псевдомонадного экзотоксина А (4D5scFv-PE40). Показаны высокая аффинность иммунотоксина к онкомаркеру, избирательность токсического действия в отношении HER2-гиперэкспрессирующих клеток и стабильность иммунотоксина при хранении. Значение IC_{50} иммунотоксина 4D5scFv-PE40 в отношении раковых клеток, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2, на 2.5–3 порядка ниже, чем в отношении клеток СНО, не экспрессирующих этот онкомаркер, и на 2.5–3 порядка ниже, чем значение IC_{50} свободного PE40 в отношении раковых клеток, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2. Полученные данные позволяют рассчитывать в перспективе на высокие значения терапевтического индекса иммунотоксина 4D5scFv-PE40 при использовании *in vivo*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА онкомаркер HER2, псевдомонадный экзотоксин А, рекомбинантный иммунотоксин, 4D5scFv, таргетная терапия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HER2 – рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (human epidermal growth factor receptor 2); scFv – одноцепочечный варибельный фрагмент антитела (single-chain variable fragment); PE40 – фрагмент псевдомонадного экзотоксина А (*Pseudomonas* exotoxin A); МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиума бромид.

ВВЕДЕНИЕ

Прогресс в изучении молекулярных основ канцерогенеза позволил выявить тонкие биохимические отличия опухолевых клеток от нормальных и, таким образом, создал предпосылки для развития методов лечения, опирающихся на эти отличия. Концепция таргетной терапии подразумевает создание препаратов, специфически взаимодействующих с молекулами-мишенями, экспрессирующимися в опухолевых клетках, но не представленными в нормальных тканях. Этот подход позволяет прицельно элиминировать опухолевые клетки с минимальным негативным воздействием на другие ткани и органы.

К таргетным препаратам относят, в первую очередь, моноклональные антитела, специфически взаимодействующие с поверхностными рецепторами-онкомаркерами (включая антиангиогенные антитела) [1, 2] и низкомолекулярные ингибиторы ферментов [3]. Для усиления специфического воз-

действия на опухоль в состав препаратов на основе антител может быть введен дополнительный токсический компонент [4]. Первым таким бифункциональным соединением стал препарат Kadcyra® [5], введенный в клиническую практику для лечения метастатического рака молочной железы в конце 2013 года. Этот препарат представляет собой химический конъюгат полноразмерного гуманизированного антитела, специфичного к онкомаркеру HER2, и токсического соединения, ингибирующего ассоциацию тубулиновых субъединиц при сборке микротрубочек. В случае, когда и направляющий, и эффекторный (токсический) модули представлены белковыми молекулами, принципиально возможным становится объединение их в единую полипептидную цепь методами генной инженерии. Рекомбинантные бифункциональные белки, получившие название иммунотоксинов, представляются исключительно перспективными соединениями с точки зрения даль-

нейшего развития таргетного лечения опухолей благодаря строго контролируемому составу, возможности биотехнологической наработки в бактериальных продуцентах, возможности оптимизации свойств методами генной инженерии и т.п. [6].

В рамках данной работы исследованы физико-химические и функциональные свойства нового HER2-специфичного рекомбинантного иммунотоксина, полученного на основе антитела формата scFv и псевдомонадного экзотоксина А.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение и характеристика белков

Наработку рекомбинантного иммунотоксина 4D5scFv-PE40 и свободных полипептидов 4D5scFv и PE40 (ETA) осуществляли в культуре *Escherichia coli* штамма BL21, предварительно трансформированной плазмидами pSD-4D5scFv-PE40, pSD-4D5scFv и pSD-PE40, содержащими гены белков 4D5scFv-PE40, 4D5scFv и PE40 соответственно, под контролем *lac*-промотора. Используемые плазмиды были получены на основе векторов pIG6-4D5 и pIG6-4D5МОСВ-ETA [7, 8].

Очистку белков осуществляли в две стадии методами Ni²⁺-хелатной аффинной хроматографии с использованием колонки HisTrap FF 1 ml (GE Healthcare, США) и ионообменной хроматографии на колонке Q Sepharose FF 1 ml (GE Healthcare, США).

Фракции, содержащие целевой белок, анализировали с помощью электрофореза в 12% ПААГ в денатурирующих условиях согласно стандартному протоколу [9].

Константу диссоциации комплекса 4D5scFv-PE40 с рецептором HER2 определяли методом поверхностного плазмонного резонанса на оптическом биосенсоре BIAcore 3000 (GE Healthcare, США) с использованием рекомбинантного внеклеточного

домена рецептора HER2 p185^{HER2-ECD} (Sino Biological, Inc., Китай).

Исследование цитотоксичности

В работе использовали клетки аденокарциномы яичника человека линии SKOV-3 (номер по каталогу ATCC – HTB-77), характеризующиеся гиперэкспрессией рецептора HER2, и HER2-отрицательные клетки яичника китайского хомячка CHO (ATCC – CCL-61). Для получения флуоресцентной опухолевой линии SKOV-kat клетки SKOV-3 были трансфицированы геном красного флуоресцентного белка TurboFP635 с использованием вектора pTurboFP635-C (Evrogen, Россия) [10].

Клетки выращивали в среде RPMI-1640 (HyClone, США) с 10% эмбриональной сывороткой теленка (HyClone, США) и 2 mM глутамином («ПанЭко», Россия) при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Анализ цитотоксичности исследуемых белков проводили с помощью стандартного МТТ-теста [11]. При этом обработку клеток проводили по двум схемам. Для оценки эффекта краткосрочного воздействия клетки инкубировали в присутствии исследуемых белков в течение 40 мин при 4°C. Затем несвязавшиеся белки отмывали, к клеткам добавляли ростовую среду и выращивали в течение 48 ч. В случае анализа эффекта длительного воздействия клетки выращивали в присутствии в среде исследуемых белков в течение 72 ч.

Расчет среднего значения и 95%-доверительного интервала для концентрации белка, приводящей к снижению жизнеспособности культуры в 2 раза (IC₅₀), проводили в программе GraphPad Prism 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемый иммунотоксин 4D5scFv-PE40 представляет собой единую полипептидную цепь, объединяющую направляющий и токсический модули (рис. 1).



Рис. 1. Схема рекомбинантного иммунотоксина 4D5scFv-PE40. Показаны участки, кодирующие: ompA, белый – сигнальный пептид, обеспечивающий секрецию целевого рекомбинантного белка в периплазматическое пространство; His₆, зеленый – олигогистидиновый пептид; 4D5scFv, голубой – анти-HER2-антитело 4D5scFv; H, серый – гибкий гидрофильный линкер из шарнирной области мышиного IgG (16 а.о.); PE40, сиреневый – фрагмент природного экзотоксина А из *Pseudomonas aeruginosa* (домены II, Ib и III); K, оранжевый – олигопептид KDEL

Рекомбинантный белок 4D5scFv-PE40 содержит фрагмент PE40 экзотоксина А из *Pseudomonas aeruginosa* с молекулярной массой 40 кДа без природного рецепторузнающего домена. Фрагмент PE40 присоединен к С-концу анти-HER2-антитела формата scFv (4D5scFv) через гибкий гидрофильный 16-аминокислотный линкер [12]. Благодаря этому линкеру расстояние между соединяемыми им участками белковой молекулы, 4D5scFv и PE40, составляет 2.5–2.7 нм, что позволяет двум доменам белка не испытывать стерических затруднений и сохранять свои функциональные свойства. Антитело 4D5scFv представляет собой рекомбинантный полипептид на основе слитых варибельных доменов легкой и тяжелой цепей полноразмерного антитела 4D5, специфичного к онкомаркеру HER2. Антитело 4D5scFv зарекомендовало себя как эффективный направляющий агент при создании бифункциональных цитотоксических белков [13–18].

На С-конце молекула иммунотоксина содержит олигопептид KDEL – сигнал транслокации в эндоплазматический ретикулум. Олигогистидиновые последовательности включены на оба конца целевого белка для его очистки с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии. Сигнальный пептид отрА обеспечивает секрецию целевого рекомбинантного белка в периплазматическое пространство как для снижения его токсического действия на клетку, так и для повышения уровня растворимой фракции целевого белка при биотехнологической наработке в бактериальных продуцентах [19].

Использование для очистки рекомбинантного белка последовательно методов металл-хелатной и ионообменной хроматографии позволило получить иммунотоксин 4D5scFv-PE40 (M_r 71 кДа) с чистотой более 96%, стабильность которого подтверждена при хранении в течение 3 мес. при +4°C, что может рассматриваться как очень хороший показатель для белковых препаратов. В течение этого времени показано также сохранение гомогенности и высокой аффинности иммунотоксина 4D5scFv-PE40 к внеклеточному домену рецептора HER2 (K_d ~7 нМ). Для сравнения, K_d свободного антитела 4D5scFv, определенная тем же методом плазмонного резонанса, составляет 5.2 нМ [20].

Исследование функциональных свойств 4D5scFv-PE40 было проведено на линии клеток SKOV-kat [10], полученной путем трансфекции клеток родительской линии SKOV-3 (аденокарцинома яичника человека), характеризующейся гиперэкспрессией онкомаркера HER2, геном красного флуоресцентного белка TurboFP635. С учетом возможного влияния процедуры трансфекции на клетки особое внимание было уделено сохранению их морфологии и феноти-

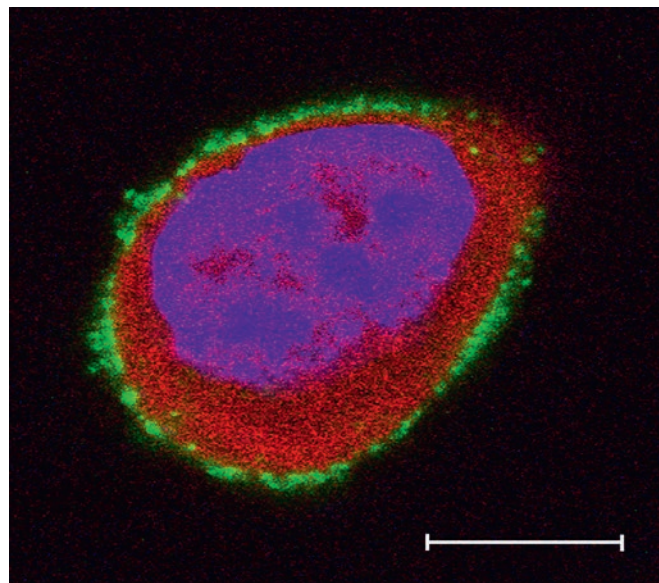


Рис. 2. Клетка линии SKOV-kat, экспрессирующая красный флуоресцентный белок TurboFP635 (красный). Ядро клетки окрашено Hoechst 33342 (синий). Экспрессия рецептора HER2 на поверхности клетки подтверждена окрашиванием комплексами квантовых точек с анти-HER2-антителом 4D5scFv [21] (зеленый). Масштаб – 10 мкм

па. Предварительно методом иммунофлуоресцентного анализа с использованием HER2-направленных комплексов полупроводниковых квантовых точек [21] было подтверждено сохранение гиперэкспрессии рецептора HER2 на поверхности трансфицированных клеток (рис. 2).

Анализ цитотоксичности 4D5scFv-PE40 в условиях короткой (40 мин) инкубации на холоде продемонстрировал высокоизбирательное токсическое действие в отношении клеток SKOV-kat (таблица). Поскольку данные условия препятствуют интернализации белков, очевидно, что именно специфическое связывание с рецептором HER2 и удержание на мембране оказывают влияние на метаболизм клеток при их последующем культивировании после удаления иммунотоксина из среды.

В условиях организма характерно длительное присутствие лекарственного препарата в крови и особенно в межклеточном матриксе. В опытах *in vitro* было показано, что селективность цитотоксического действия 4D5scFv-PE40 на клетки SKOV-kat сохраняется даже при 72-часовом присутствии препарата в ростовой среде. Концентрация 4D5scFv-PE40, приводящая к двукратному снижению жизнеспособности культуры клеток SKOV-kat (IC_{50}),

Цитотоксичность белков 4D5scFv-PE40, PE40 и 4D5scFv

Клеточная линия	IC ₅₀ , нМ*					
	Кратковременное воздействие (40 мин)			Длительное воздействие (72 ч)		
	4D5scFv- PE40	PE40	4D5scFv	4D5scFv- PE40	PE40	4D5scFv
CHO	> 1000	>1000	> 1000	8.7 (5.6–13.6)	2.9 (1.8–4.6)	> 100
SKOV-kat	22** (5.7–85.3)	> 1000	> 1000	0.008** (0.006–0.013)	4.9 (1.3–18.4)	> 100
SKOV-3	–	–	–	0.017** (0.011–0.025)	6.6 (3.1–14.0)	> 100

*Указано среднее значение и 95% доверительный интервал.
**Статистически значимое отличие от CHO.

на 3 порядка ниже IC₅₀ 4D5scFv-PE40 в отношении клеток CHO, не экспрессирующих рецептор HER2. Необходимо отметить проявление токсического действия и самого PE40 в этих условиях, однако IC₅₀ полипептида PE40 в отношении клеток SKOV-3 и SKOV-kat также превышает IC₅₀ иммунотоксина 4D5scFv-PE40 на 2.5–3 порядка. Полученные результаты позволяют рассчитывать в перспективе на высокие значения терапевтического индекса данного иммунотоксина при использовании *in vivo*.

Хорошо известна устойчивость SKOV-3, исходной линии для получения SKOV-kat, к действию цитотоксических агентов [22]. Тем не менее токсичность 4D5scFv-PE40 в отношении SKOV-3 также проявлялась в пиколярном диапазоне концентраций и несущественно отличалась от таковой для SKOV-kat (таблица).

Флуоресцирующие опухолевые клеточные линии являются уникальным по своим возможностям инструментом исследований. Благодаря экспрессии флуоресцентного белка опухолевыми клетками SKOV-kat продолжение исследований созданного иммунотоксина 4D5scFv-PE40 на экспериментальных опухолевых моделях на основе этих клеток становится возможным с применением высокоинформативных методов прижизненной оптической визуализации на уровне целого организма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успехи первых таргетных противоопухолевых препаратов принципиально изменили подход к разработке новых средств противоопухолевой терапии и привели к изменению стандартов лечения многих видов онкологических заболеваний. Наибольший успех достигнут в онкогематологии и лечении диссеминированных опухолей, однако и в случае лечения солидных опухолей определенного молекулярного профиля показано преимущество таргетного подхода.

Исследованный в работе иммунотоксин 4D5scFv-PE40 предназначен для таргетной терапии опухолей, экспрессирующих онкомаркер HER2. Специфичность данного иммунотоксина идентична таковой известного противоопухолевого препарата Герцептин®. В то же время наличие токсического модуля в составе 4D5scFv-PE40 многократно увеличивает специфическую токсичность данного белка в отношении HER2-экспрессирующих клеток и позволяет рассчитывать на его эффективность в ходе последующих исследований терапевтического потенциала в экспериментах *in vivo*. ●

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (проект RFMEFI57814X0051).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. // Russ. Chem. Rev. 2015. V. 84 (1). P. 1–26.
2. Hojjat-Farsangi M. // Tumour Biol. 2015. V. 36. P. 543–556.
3. Roskoski R., Jr. // Pharmacol. Res. 2015. V. 100. P. 1–23.

4. Weiner G.J. // Nat. Rev. Cancer. 2015. V. 15. Issue 6. P. 361–370.
5. Lambert J.M., Chari R.V. // J. Med. Chem. 2014. V. 57. P. 6949–6964.
6. Alewine C., Hassan R., Pastan I. // Oncologist. 2015. V. 20. № 2. P. 176–185.

7. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 1486–1492.
8. Di Paolo C., Willuda J., Kubetzko S., Lauffer I., Tschudi D., Waibel R., Plückthun A., Stahel R.A., Zangemeister-Wittke U. // *Clin. Cancer Res.* 2003. V. 9. P. 2837–2848.
9. Laemmli U.K., Beguin F., Gujer-Kellenberger G. // *J. Mol. Biol.* 1970. V. 47. P. 69–85.
10. Zdobnova T., Sokolova E., Stremovskiy O., Karpenko D., Telford W., Turchin I., Balalaeva I., Deyev S. // *Oncotarget.* 2015. DOI: 0.18632/oncotarget.5130.
11. Mosmann T. // *J. Immunol. Methods.* 1983. V. 65. P. 55–63.
12. Muller K.M., Arndt K.M., Strittmatter W., Pluckthun A. // *FEBS Lett.* 1998. V. 422. P. 259–264.
13. Edelweiss E., Balandin T.G., Ivanova J.L., Lutsenko G.V., Leonova O.G., Popenko V.I., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // *PLoS One.* 2008. V. 3. e2434.
14. Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N.V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // *Invest. New Drugs.* 2011. V. 29. Issue 1. P. 22–32.
15. Serebrovskaya E.O., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Deyev S.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 9221–9225.
16. Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // *Theranostics.* 2013. V. 3. P. 831–840.
17. Cao Y., Marks J.W., Liu Z., Cheung L.H., Hittelman W.N., Rosenblum M.G. // *Oncogene.* 2014. V. 33. P. 429–439.
18. Zhang M., Qiu Z., Li Y., Yang Y., Zhang Q., Xiang Q., Su Z., Huang Y. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 97. P. 3913–3923.
19. Pines O., Inouye M. // *Mol. Biotechnol.* 1999. V. 12. P. 25–34.
20. Соколова Е.А., Здобнова Т.А., Стремовский О.А., Балалаева И.В., Деев С.М. // *Биохимия.* 2014. Т. 79. Вып. 12. С. 1682–1688. (Sokolova E.A., Zdobnova T.A., Stremovskiy O.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. // *Biochemistry (Moscow).* 2014. V. 79. Issue 12. P. 1376–1381.)
21. Balalaeva I.V., Zdobnova T.A., Krutova I.V., Brilkina A.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *J. Biophotonics.* 2012. V. 5. № 11–12. P. 860–867.
22. Morimoto H., Safrit J.T., Bonavida B. // *J. Immunol.* 1991. V. 147. P. 2609–2616.