

УДК 578.233.22

Мишень-специфичная доставка генов с помощью рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц, способных эффективно связываться с наноантителами

М. Н. Гарас^{1*}, С. В. Тиллиб², О. В. Зубкова¹, В. Н. Рогожин^{1,3}, Т. И. Иванова², Л. А. Васильев², Д. Ю. Логунов¹, М. М. Шмаров¹, И. Л. Тутыхина¹, И. Б. Есмагамбетов¹, И. Ю. Грибова¹, А. С. Банделюк¹, Б. С. Народицкий¹, А. Л. Гинцбург¹

¹Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

²Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

³Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, 109472, Москва, ул. Акад. Скрябина, 23

*E-mail: max.garas@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.10.2013

После доработки 08.04.2014

РЕФЕРАТ Существующие на сегодняшний день подходы по изменению тропизма генетических векторов требуют получения отдельного вектора для каждого целевого рецептора, что создает дополнительные временные и экономические затраты. В связи с этим большой интерес представляет универсальная векторная система, которая позволит специфически связывать на своей поверхности молекулы, обеспечивающие эффективную мишень-специфичную доставку («таргетинг»). В представленном исследовании предложен новый подход к получению таргетных носителей с использованием рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц (РПАН) на основе генома аденовируса человека серотипа 5 с модифицированным геном капсидного белка рIX (Ad5-EGFP-рIX-ER). Такие РПАН способны с высокой аффинностью связывать на своей поверхности соответственно модифицированные химерные наноантитела, специфически узнающие определенный антиген (раковоэмбриональный антиген, РЭА). Эффективное связывание наноантител (аСЕА-RE) с поверхностью капсидов РПАН доказано с помощью иммуоферментного анализа. Способность полученного вектора к таргетной доставке доказана в эксперименте с использованием опухолевых клеточных линий A549 и Lim1215, экспрессирующих РЭА. Показано, что Ad5-EGFP-рIX-ER, несущий на поверхности аСЕА-RE, в 3 раза более эффективно проникает в опухолевые клетки линий A549 и Lim1215 независимо от рецепторов коксаки- и аденовируса путем, чем немодифицированные РПАН и препарат Ad5-EGFP-рIX-ER без адсорбции наноантител на поверхности капсида. Полученный нами препарат РПАН Ad5-EGFP-рIX-ER представляет собой универсальную платформу, которая посредством специфического присоединения на поверхности РПАН молекул наноантител против определенного поверхностного антигена может обеспечить доставку целевого гена в заданные клетки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аденовирус, рIX, лейциновая молния, наноантитела, раковоэмбриональный антиген.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БОЕ – бляшкообразующая единица; РЭА – раковоэмбриональный антиген; Ad – аденовирус человека; Ad5 – Ad серотипа 5; CAR – коксакивирусный и аденовирусный рецептор; а.о. – аминокислотный остаток, при числе.

ВВЕДЕНИЕ

Препараты рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц (РПАН), полученные на основе генома аденовируса человека серотипа 5 (Ad5) с делецией области, ответственной за репликацию, рассматриваются как одни из наиболее перспективных средств достав-

ки генетической информации в клетки млекопитающих. РПАН широко используются для разработки рекомбинантных вакцин и генотерапевтических средств [1, 2]. Безопасность РПАН подтверждена целым рядом клинических испытаний различных вакцинных и терапевтических препаратов на основе ге-

нома Ad5. С 2008 года в одной четверти клинических испытаний по генной терапии исследуются РПАН на основе Ad [3]. Кроме того, в Китае уже разрешены два препарата на основе Ad5. Такая популярность объясняется целым рядом преимуществ: векторы на основе Ad5 способны трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки; ДНК аденовируса не интегрируется в геном клетки-хозяина и остается в экстрахромосомной форме; РПАН могут быть получены в титре более 10^{10} БОЕ/мл, что может позволить использовать их в качестве живых рекомбинантных вакцин; РПАН обеспечивают высокий уровень экспрессии целевого гена в клетке-мишени.

Однако следует отметить, что существует ряд ограничений для применения РПАН на основе Ad5. Например, низкая эффективность трансдукции некоторых типов клеток млекопитающих, в частности опухолевых клеток человека. Это связано с тем, что первичный рецептор Ad5 – коксаки- и аденовирусный рецептор (CAR) – экспрессируется не на всех типах клеток [4–6]. Для таргетной доставки генов в CAR-дефицитные и CAR-негативные клетки разработаны технологии модификации белков капсида Ad5 (отростка пентона, гексона, rIX, rIIIa). На сегодняшний день существуют стратегии, которые позволяют направлять РПАН на основе Ad5 в клетки различного типа, например в клетки рака шейки матки, глиомы, почечно-клеточного рака, рака яичника, а также в гладкомышечные клетки сосудов [7–12].

В последнее время в качестве мишени для встраивания белковых лигандов в капсид аденовируса большой интерес вызывает минорный капсидный белок IX (rIX). Преимущества его модификации – возможность встраивания на С-конец относительно крупных пептидных фрагментов; высокая структурная совместимость rIX со встраиваемыми лигандами и широкий спектр возможных направлений использования аденовекторов с модификацией rIX [13].

Недавно было показано, что введение в структуру rIX RGD-мотива (аргинин-глицин-аспарагиновая кислота) позволяет увеличивать эффективность связывания РПАН на основе Ad5 с клетками, экспрессирующими $\alpha_v\beta$ -интегрины [14]. Получены также РПАН, несущие на С-конец rIX одноцепочечный Т-клеточный рецептор (TCR) против ассоциированного с меланомой антигена в комплексе с HLA I (главный комплекс гистосовместимости), способные эффективно трансдуцировать клетки меланомы человека [15].

Следует отметить, что существующие на сегодняшний день подходы по модификации rIX требуют получения отдельного препарата РПАН для каждого целевого рецептора, что создает дополнительные временные и экономические затраты. В связи с этим

большой интерес представляет получение универсальной технологической платформы на основе РПАН, которая позволит специфически связывать на поверхности капсида аденовируса молекулы, обеспечивающие эффективную мишень-специфичную доставку (таргетинг).

Для разработки такой универсальной платформы были получены РПАН, несущие на С-конец rIX особый синтетический домен $EE_{12}RR_{345}L$ (ER-домен), способный с высокой эффективностью гетеродимеризоваться с доменом-партнером – $RR_{12}EE_{345}L$ (RE-домен) с образованием стабильной структуры (лейциновой молнии). Эти синтетические домены были получены ранее генно-инженерным путем на основе соответствующего домена из белка, связывающегося с геном вителлогенина (VBP) [16, 17]. Каждый из двух указанных 43-аминокислотных доменов не способен гомодимеризоваться даже при низких температурах (от 6°C и выше), но при этом способен к эффективной гетеродимеризации при физиологических условиях с образованием стабильной структуры лейциновой молнии $EE_{12}RR_{345}L/RR_{12}EE_{345}L$ (или ER/RE), которая имеет температуру плавления 73°C и константу диссоциации $K_d = 1.3 \times 10^{-11}$ М [17].

Следует отметить, что подход к модификации РПАН на основе Ad, весьма сходный с использованным в нашей работе, недавно уже был описан [18]. Однако в представляемой нами работе есть существенные отличия, касающиеся как модификации иного капсидного белка, так и использования другого формата антитела, а также способа получения комбинированного вектора.

Мы предлагаем использовать в качестве носителя ER-домена белок IX, так как количество мономеров rIX на капсиде Ad5 в 6 раз больше, чем мономеров отростка пентона, следовательно, и антител с РПАН будет связываться больше, что обеспечит более эффективное проникновение rIX-модифицированных РПАН в целевые клетки.

В качестве молекулы, обеспечивающей таргетинг модифицированных РПАН к определенным клеткам, в данной работе применяли однодоменные антитела (наноантитела) к раковоэмбриональному антигену (РЭА, или СЕА, carcinoembryonic antigen) (aCEA-RE). Выбор наноантител был обусловлен рядом их преимуществ, к которым, в частности, относятся простота всевозможных генно-инженерных модификаций, сниженный иммунный ответ, лучшая фармакокинетика, хорошая растворимость, устойчивость к изменениям рН-среды и высокая термостабильность. Выбор наноантител к РЭА обусловлен высокой частотой встречаемости данного рецептора на опухолевых клетках. Важным фактором выбора именно наноантител стал имеющийся у нас опыт по их получению и использо-

ванию, в том числе с введением в их состав гомотриме- ризирующегося домена изолейциновой молнии [19, 20], а также по использованию РПАН для экспрессии на- ноантител *in vivo* [21, 22].

Использованные аСЕА-RE способны эффектив- но узнавать антиген РЭА, в повышенном количе- стве представленный на поверхности опухолевых клеточных линий A549 и Lim1215. В данной работе показано, что рIX-модифицированные РПАН (Ad5-EGFP-рIX-ER), несущие на своей поверхности нано- антитела аСЕА-RE, в 3 раза более эффективно про- никают в опухолевые клетки линий A549 и Lim1215 SAR-независимым путем, чем немодифицированный РПАН (Ad5-EGFP) и препарат Ad5-EGFP-рIX-ER (без присоединения наноантител на поверхности капсида). Полученная нами векторная система Ad5-EGFP-рIX-ER представляет собой универсальную платформу, которая посредством специфического присоединения на поверхности РПАН молекул на- ноантител против определенного (опухолеспецифи- ческого) поверхностного антигена может обеспечить доставку нужного гена в заданные (опухолевые) клетки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плазмидные векторы

В работе использовали плазмидный вектор pBluescript II SK (+) (Fermentas MBI, Литва), плазмидную систему pGEM-T-Easy (Promega, США); челночный вектор pShuttle-CMV-EGFP, содержащий промотор цитомегаловируса (CMV), репортерный ген зеленого флуоресцентного белка (EGFP) и фрагмен- ты генома Ad5, плазмиду pAdEasy-1 (Stratagene, США).

Препараты РПАН и бактериальные штаммы

РПАН Ad5-EGFP, содержащие полноразмерный геном аденовируса Ad5 и кассету экспрессии с ре- портерным геном зеленого флуоресцентного белка под контролем промотора цитомегаловируса, полу- чены ранее в НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи [23].

В работе использовали клетки *Escherichia coli* штаммов DH5 α и BJ5183.

Клеточные линии

В работе использовали следующие линии клеток: HEK293 (клетки почки эмбриона человека, несущие E1-область Ad5), A549 (аденокарцинома легкого че- ловека), H1299 (немелкоклеточный рак легкого че- ловека), H460 (рак легкого человека), H292 (мукоэпи- телиоидная карцинома легкого человека), Lim1215 (аденокарцинома толстой кишки человека), SW480 (аденокарцинома толстой кишки человека), HCT-116

(рак толстой кишки человека). Клетки культивиро- вали в среде DMEM (минимальная среда Игла, мо- дифицированная Дульбекко) с добавлением 10% эм- бриональной сыворотки телят производства Hyclone (США), глутамина, пенициллина и стрептомицина.

Ферменты

Специфические эндонуклеазы рестрик- ции, ДНК-лигаза фага T4 и другие ферменты полу- чены от фирм Promega (США), New England BioLabs (США), Fermentas MBI (Литва).

Конструирование плазмид, кодирующих последовательности ER- или RE-доменов лейциновой молнии

Гетеродимеризирующиеся последовательности ER- или RE-доменов [17, 18] клонировали с помощью ПЦР (рис. 1) с использованием праймеров, представленных в таблице. При амплификации с парой прайме- ров ER1F и ER1R (для ER-домена) или RE1F и RE1R (для RE-домена) был получен ПЦР1-продукт раз- мером 97 п.н. (ПЦР1). При амплификации с прайме- рами ER2F и NotI-Cend-Zipper-rev (для ER-домена) или RE2F и NotI-Cend-Zipper-rev (для RE-домена) получен ПЦР2-продукт из 71 п.н. (ПЦР2). В сле- дующей ПЦР в качестве праймеров использовали ПЦР1- и ПЦР2-продукты и получили ПЦР3-продукт из 154 п.н., содержащий последовательность ER- или RE-доменов лейциновой молнии. Этот фрагмент затем встроили по сайтам XhoI и NotI в плазмидный вектор pBluescript II SK (+) и получили соответствен- но плазмиды pER и pRE, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие полноразмерные гетеродимеризирующиеся домены. Правильность по- лученных последовательностей проверяли секве- нированием. Для удобства клонирования (введения на 5'-конец последовательности XhoI-сайта) третий нуклеотидный остаток G исходной последовательности заменяли на C, аминокислотная последователь- ность при этом полностью сохранялась.

Конструирование плазмиды, несущей геном Ad5 с делецией E1-области, кассету с геном EGFP и гетеродимеризирующуюся последовательность лейциновой молнии на C-конец рIX

Для введения ER-домена на C-конец рIX была син- тезирована последовательность (ЗАО «Евроген»), со- держащая ген рIX с делетированным стоп-кодоном, спейсер (последовательность длиннейшей α -спирали аполипопротеина человека E4 (33 а.о.)) [18], поли- линкер с рестрикторными сайтами BamHI, Kpn2I, NotI, HindIII, AscI и SmaI для встраивания целевых лигандов и ген рIVa2 (от 1 до 832 п.н.). Эта последо- вательность была клонирована в плазмидный век-

Праймеры, использованные для ПЦР-клонирования ER- и RE-последовательностей

Название праймера	Последовательность праймера
ER1F	5'-ccagaactcgagatcgaggcagctttctggaacgggagaacctgcactgg-3'
ER2F	5'-ccagcgtctgcggaaccgagtctcacagtatcgaactcgttacggacctctg-3'
ER1R	5'-tccgcagacgctggactcgctgccgagttcagctacacagatctccagtgcagtgttc-3'
RE1F	5'-ccagaactcgagatccgtgcagctttctgctcaacggaacctgcactgc-3'
RE2F	5'-ccagcgtctggagaacgaagtctcacagtatgaaactcgttacggacctctg-3'
RE1R	5'-tctccagacgctggacctctgctccagttcagctacctcagtacgcagtgcagtgttc-3'
NotI-Cend-Zipper-rev	5'-cgtacgggtagcggccgctcagagggtccgtaacgag-3'

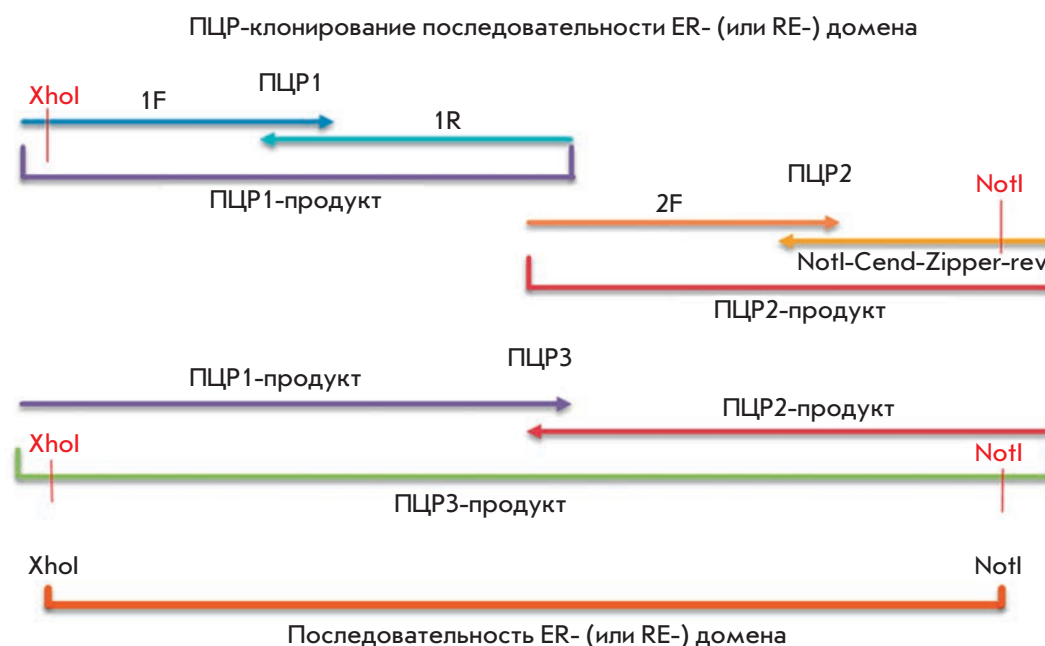


Рис. 1. Схема последовательных стадий клонирования (ПЦР1, ПЦР2 и ПЦР3). Для удобства клонирования (введения в 5'-конец последовательности XhoI-сайта) третий нуклеотидный остаток исходной последовательности заменяли с G на C, аминокислотная последовательность при этом полностью сохранялась

тор pBluescript II SK. В результате была получена плаزمида pBssk-pIX-mod, несущая ген *pIX* с сайтами для модификаций.

Нуклеотидную последовательность, кодирующую ER-домен, амплифицировали с помощью пары праймеров BamHI-zipp-forw (5'-gga-tcc-ctc-gag-atc-gag-gca-gct-ttc-c-3') и SwaI-zipp-rev (5'-att-taa-att-tac-aga-ggt-ccg-taa-cga-gtt-cg-3'), которые фланкировали 5'- и 3'-концевые участки лейциновой молнии и содержали сайты рестрикции BamHI и SwaI соответственно. В качестве матрицы использовали описанную выше плазмиду pER. ПЦР-продукт размером 146 п.н. клонировали в плазмидный вектор pGEM-T-Easy. Плазмиду pGEM-T-ER гидролизовали рестрик-

тазами BamHI и SwaI, последовательность, кодирующую лейциновую молнию, клонировали в плазмиду pBssk-pIX-mod по аналогичным сайтам рестрикции. Затем из плазмиды pBssk-pIX-ER по сайтам рестрикции AraI и HpaI вырезали фрагмент аденовирусного генома, содержащий модифицированный ген *pIX*, и клонировали в вектор pShCMV-EGFP по аналогичным сайтам. В результате был получен челночный вектор pShCMV-EGFP-pIX-ER, кодирующий модифицированную последовательность *pIX* с лейциновой молнией на C-конце и несущий кассету с репортерным геном *EGFP*. Данную плазмиду лиnearизовали по PmeI и котрансформировали вместе с плазмидой pAdEasy-1 в клетки *E. coli* BJ5183

как описано в AdEasy Adenoviral Vector System (Stratagene, США). В результате гомологичной рекомбинации была получена плаزمида pAd5-EGFP-pIX-ER, в состав которой вошли полноразмерный геном Ad5 с делецией E1-области, экспрессионная кассета с репортерным геном *EGFP* и фрагмент, кодирующий лейциновую молнию на C-конце pIX.

Получение, накопление и очистка pIX-модифицированных РПАН

РПАН были получены в результате трансфекции клеток линии HEK293 плазмидой pAd5-EGFP-pIX-ER, предварительно линейаризованной по сайту рестрикции PacI. Трансфекцию проводили с помощью реагента Metafectene Pro (Biontech, Германия). Ad5-EGFP-pIX-ER накапливали в культуре клеток линии HEK293. Препарат РПАН очищали и концентрировали ультрацентрифугированием лизатов зараженных клеток в градиенте плотности хлористого цезия. Количество РПАН в очищенном препарате определяли спектрофотометрически ($\lambda = 260$ нм), используя коэффициент пересчета 1 о.е. = 1.12×10^{12} вирусных частиц/мл. Титр препарата Ad5-EGFP-pIX-ER определяли методом бляшкообразования на культуре клеток HEK293.

Антитела

В работе использовали коммерческие анти-CAR-поликлональные антитела (R&D systems, США, cat. #AF3336), мышинные сыворотки, содержащие анти-Ad-антитела, полученные в результате иммунизации мышей препаратом РПАН, вторичные лошадиные антитела (GE Healthcare, Великобритания), анти-НА-моноклональные антитела (CHGT-45P-Z, ICL, Inc., США).

Получение aCEA с дополнительным концевым RE-доменом

Получение однодоменных мини-антител (наноантител), узнающих раковый эмбриональный антиген (aCEA), проводили как описано ранее [24–28].

Двугорбого верблюда *Camelus bactrianus* иммунизировали последовательно (5 раз) путем подкожного введения антигенного материала, смешанного с равным объемом полного (при первой инъекции) или неполного (при остальных инъекциях) адъюванта Фрейнда. В качестве антигена использовали белок РЭА человека (кат. номер R224) «Хема Медика» (Россия). Брали 0.26 мг белка для каждой инъекции. Вторую инъекцию (стадию иммунизации) проводили через 3 недели после первой, затем с интервалом в 2 недели проводили еще три иммунизации. Кровь (150 мл) забирали через 5 дней после последней инъекции. Далее из В-лимфоцитов вы-

деляли РНК, проводили синтез кДНК, двухступенчатую ПЦР и клонирование амплифицированных последовательностей, кодирующих наноантитела, в фагидном векторе pHEN4. Процедуру селекции проводили методом фагового дисплея [24–28], в котором в качестве фага-помощника использовали бактериофаг M13KO7 (New England BioLabs, США), а в качестве антигена, иммобилизованного на дне лунок 96-луночного ИФА-планшета, тот же препарат белка РЭА человека, что и для иммунизации. Отобранные методом фагового дисплея клоны кДНК, кодирующих наноантитела, клонировали в новый экспрессионный вектор, при этом к их 3'-концу добавляли дополнительные последовательности-метки (таги), кодирующие НА и (His)₆, с целью повышения эффективности детекции и очистки экспрессируемых наноантител. Специфичность и относительную аффинность исходно отбираемых наноантител определяли с помощью иммуноферментного анализа по связыванию с иммобилизованным белком РЭА человека, а затем и с фиксированными культуральными клетками, на поверхности которых должен сверхэкспрессироваться РЭА. В результате тестирования из нескольких вариантов было отобрано одно наиболее эффективно работающее наноантитело, анти-РЭА/aCEA1. (Последовательность этого антитела, детали его получения и анализа описаны в недавно поданной заявке № 2012113421 на патент РФ: Тиллиб С.В. Однодоменное наноантитело aCEA1, специфически связывающее белок CEA.) Для того чтобы aCEA1 могло образовывать стабильный комплекс с модифицированным pIX Ad5 (pIX-ER), его модифицировали далее, как описано ранее [20], но вместо гомотримеризующегося домена (ILZ) в данном случае добавляли домен RE, способный эффективно образовывать димер (лейциновую молнию) с ER-доменом. Схема аминокислотных доменов форматированного наноантитела aCEA-RE показана на рис. 2Б. Нарботанное в периплазме бактерий и очищенное, как описано ранее [20], наноантитело выявляется в виде индивидуальной полосы при электрофорезе в 14% SDS-полиакриламидном геле (рис. 3А).

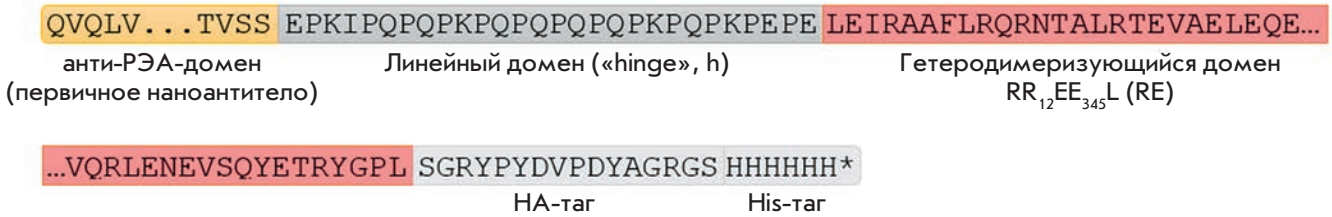
Имуноферментный анализ связывания лейциновых молний в составе pIX РПАН и в молекулах рекомбинантных наноантител

Поверхность лунок 96-луночного планшета сенсibilizировали раствором aCEA-RE в 40 мМ калий-карбонатном буфере (pH 9.6) из расчета 2 мкг антител на лунку. Сенсibilизацию проводили при +4°C в течение 12 ч. Затем планшет отмывали 3 раза 0.05% Твин-20 и 3 раза дистиллированной водой. Далее вносили раствор Ad5-EGFP-pIX-ER в концентрации 1 мкг/мл в рабочем буфере. В качестве контроля ис-

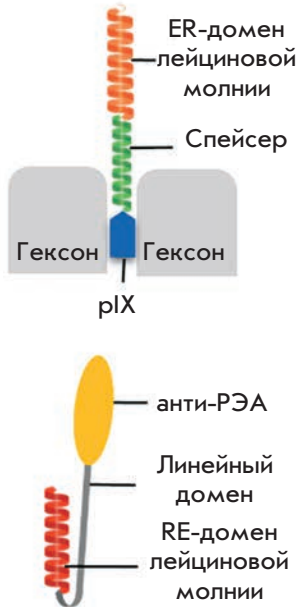
А



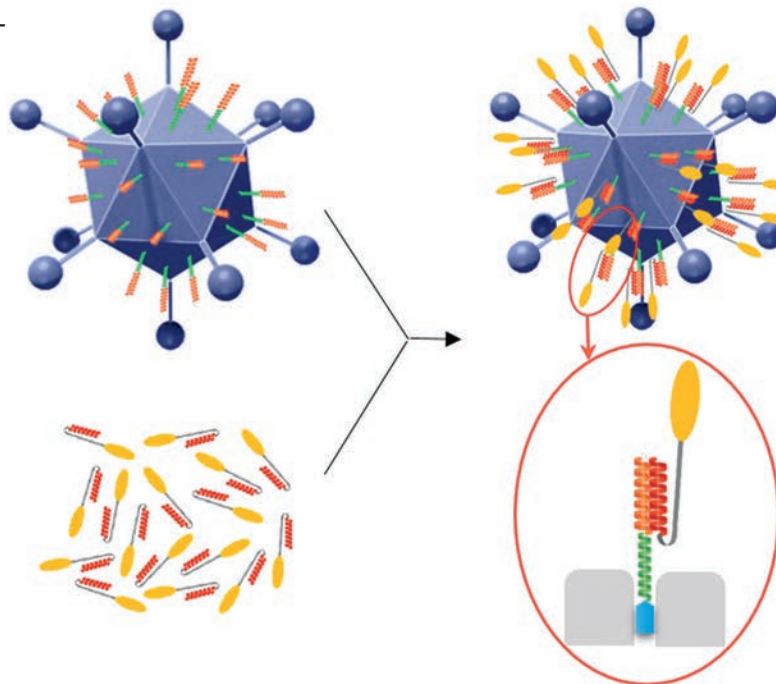
Б



В



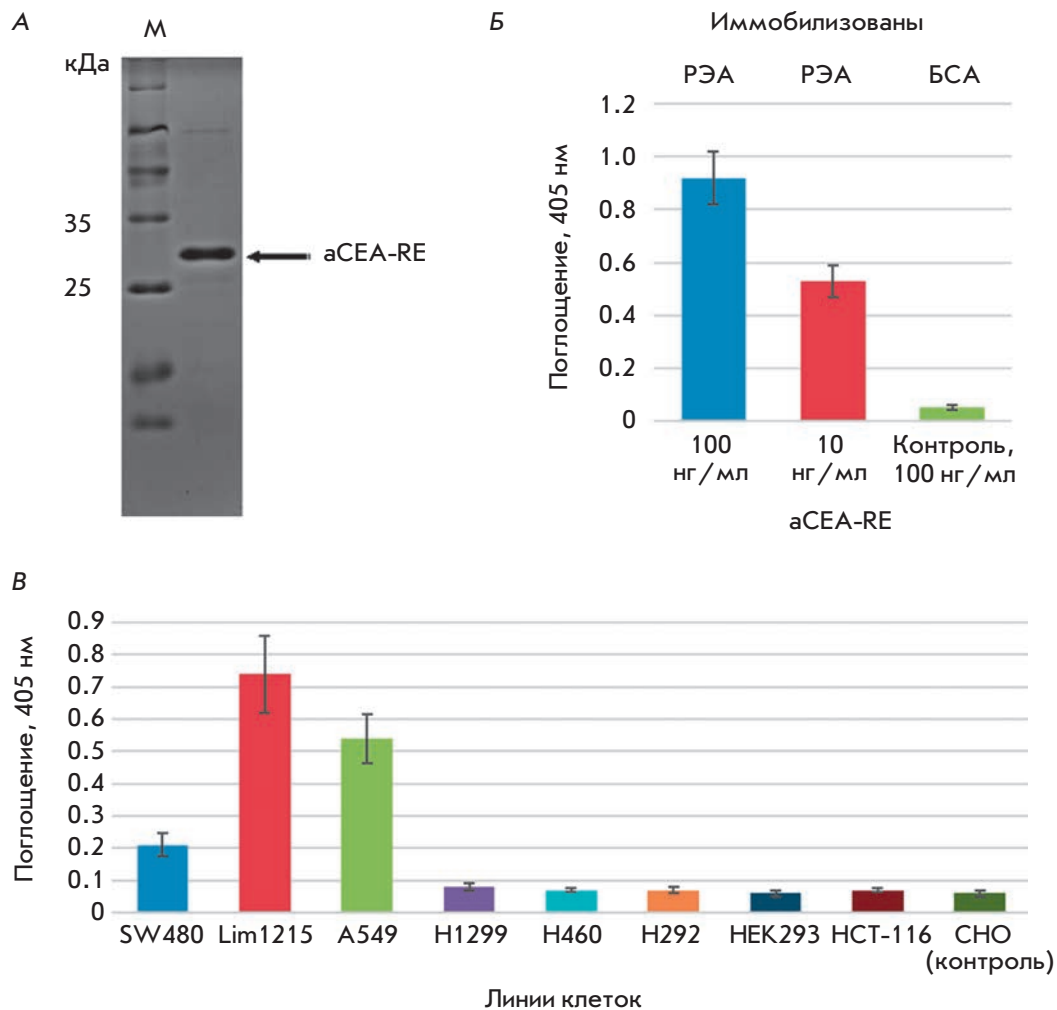
Г



Комплекс Ad5-EGFP-pIX-ER/aCEA-RE

Рис. 2. Схематическое изображение строения рекомбинантных наноантител, структуры pIX со спейсером и ER-доменом лейциновой молнии и образование комплекса Ad5-EGFP-pIX-ER/aCEA-RE с измененным тропизмом. Схема аминокислотных доменов рекомбинантного pIX (А) и полученного химерного наноантитела аCEA-RE (Б). В – конфигурация комплементарных доменов лейциновой молнии, где один пришит к С-концу pIX Ad5 и экспонируется над поверхностью капсида за счет спейсера, а другой – к N-концу аCEA. Г – образование комплекса Ad5-EGFP-pIX-ER/aCEA-RE за счет гетеродимеризации ER- и RE-доменов лейциновых молний

Рис. 3. Иммуноферментный анализ связывания нанокантата аСЕА-РЕ с белком РЭА. **А** – электрофоретический анализ в 14% SDS-полиакриламидном геле очищенного аСЕА-РЕ. **Б** – иммуноферментный анализ связывания нанокантата аСЕА-РЕ с иммобилизованным белком РЭА человека. Нанокантата аСЕА-РЕ вносили в концентрации 100 и 10 нг/мл. В качестве контроля использовали лунки с иммобилизованным бычьим сывороточным альбумином. **В** – иммуноферментный анализ связывания нанокантата аСЕА-РЕ с РЭА на поверхности опухолевых клеток



пользовали Ad-EGFP. Планшет инкубировали в течение 1 ч при +37°C на шейкере, а затем отмывали. Вносили различные разведения мышинных сывороток в рабочем растворе (от 1 : 800 до 1 : 204800), содержащих анти-Ad-антитела. Смесь инкубировали (1 ч, +37°C) на шейкере, затем планшет отмывали и вносили антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, в рабочем разведении 1 : 10000 в фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7.4 с 0.05% Твин-20. Реакцию проявляли ТМВ-индикаторной смесью. Для остановки реакции использовали 4 M H₂SO₄. Оптическую плотность окрашенного продукта пероксидазной реакции определяли на приборе iEMS Reader MF (Thermo labsystems) при длине волны 450 нм.

Иммуногистохимический анализ связывания нанокантата аСЕА-РЕ с антигеном (РЭА) как очищенным, так и на поверхности клеток

Способность нанокантата аСЕА-РЕ связываться с иммобилизованным в лунках иммунологической

плашки белком РЭА человека проверяли с использованием стандартного протокола иммуноферментного анализа. Контролем служили лунки с иммобилизованным бычьим сывороточным альбумином (БСА). В качестве вторичных антител к НА-тагу на С-конце проверяемого нанокантата использовали конъюгированные с пероксидазой хрена анти-НА-моноклональные антитела. Активность пероксидазы хрена определяли, используя в качестве хромогенного субстрата АВТС (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат). Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм с помощью планшетного флуориметра. Контрольные лунки (с иммобилизованным БСА) не содержали антиген, далее они были блокированы и процессированы параллельно с экспериментальными ячейками (с антигеном).

Возможность применения полученного нанокантата для детекции РЭА, экспрессирующегося на поверхности опухолевой клетки, проверяли с помощью иммуноферментного анализа на иммобилизованных/

фиксированных клетках. Использовали следующие линии клеток: A549, H1299, H460, H292, Lim1215, SW480, HCT-116. Негативным контролем служили клетки линии HEK293 (происходящей из клеток эмбриональной почки человека), в которых, согласно опубликованным данным, белок РЭА не детектируется. Другим отрицательным контролем были клетки яичников китайского хомячка (CHO). Клетки рассеивали на 96-луночный планшет по 10^4 клеток на лунку. На следующий день клетки 3 раза промывали раствором PBS и фиксировали в 3.7% растворе забуференного формальдегида в течение 10 мин. Фиксацию останавливали, добавляя раствор глицина до концентрации 125 мМ, фиксированные клетки промывали 3 раза раствором PBS, затем блокировали в растворе 1% БСА, $1 \times$ PBS в течение 2 ч, после чего споласкивали $1 \times$ PBS и добавляли раствор ($1 \times$ PBS, 0.1% БСА) с наноантителом аСЕА-RE в концентрации 100 нг/мл. В качестве вторичных антител к HA-тагу на С-конце проверяемого наноантитела аСЕА-RE использовали конъюгированные с пероксидазой хрена анти-HA-моноклональные антитела. Активность пероксидазы хрена определяли, используя в качестве хромогенного субстрата ABTS. Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм с помощью планшетного флуориметра. Контрольные лунки (с иммобилизованными клетками линии HEK293 и CHO) были блокированы и процессированы параллельно с экспериментальными ячейками.

Анализ термостабильности рIX-модифицированных РПАН

Культуру клеток HEK293 рассеивали на 24-луночный планшет по 10^5 клеток на лунку. Через 24 ч монослой клеток инфицировали препаратом аденовируса (10^3 вирусных частиц на клетку в 200 мкл среды). Предварительно образцы инкубировали при $+37$ и $+42^\circ\text{C}$ в течение 5, 15 и 30 мин. Через 24 ч определяли количество флуоресцирующих клеток с помощью проточной цитофлуориметрии (Becton Coulter Cytomix FC-500, США).

Трансдукция препаратом РПАН эукариотических клеток с заблокированными CAR-рецепторами

Культуру клеток A549 и Lim1215 рассеивали на 48-луночный планшет по 2×10^4 клеток на лунку, затем добавляли анти-CAR-антитела в концентрации 10 мг/мл. Клетки инкубировали в течение 30 мин при $+37^\circ\text{C}$, раствор антител удаляли, клетки промывали и трансдуцировали препаратами РПАН из расчета 500 вирусных частиц на клетку. Эти препараты предварительно инкубировали при $+4^\circ\text{C}$ в течение 30 мин при постоянном перемешивании с аСЕА-RE в соотношении одна вирусная частица на 240 молекул

антител. Не связавшиеся РПАН удаляли, через 24 ч после трансдукции определяли относительное количество флуоресцирующих клеток с помощью проточной цитофлуориметрии (Becton Coulter Cytomix FC-500, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц с модифицированным белком rIX

В 2009 году J.N. Glasgow и соавт. провели исследование. К С-концу отростка пентона Ad5 они «привязали» лейциновую молнию, с помощью которой капсид Ad5 был способен специфически связываться с одноцепочечными антителами, несущими комплементарную лейциновую молнию, благодаря чему РПАН меняли свой тропизм и обеспечивали целевую доставку гена [18]. Целью нашей работы было получение РПАН на основе Ad5, несущих последовательность лейциновой молнии на С-конце rIX. Мы предположили, что аналогичная модификация rIX позволит получить более эффективный вектор для доставки целевых генов. Это связано с тем, что на поверхности одного капсида Ad5 располагается 240 мономеров rIX и 36 мономеров отростка пентона, поэтому с rIX-модифицированными РПАН будет связываться значительно больше антител, чем с аденовирусами с модификацией отростка пентона. Однако непосредственное присоединение какого-либо пептида может привести к созданию конформационных помех для сборки РПАН, так как С-конец rIX находится между расположенными рядом гексонами капсида [29]. Поэтому между С-концом rIX и лейциновой молнией в качестве спейсера мы ввели последовательность самой длинной α -спирали аполипопротеина человека E4, которая, как показали J. Vellinga и соавт. [30], наиболее эффективна и при этом несущественно влияет на сборку Ad. Такой спейсер позволяет экспонировать лейциновую молнию над поверхностью капсида и таким образом повышать эффективность ее взаимодействия с рекомбинантными наноантителами (рис. 2) [30].

Рекомбинантный вектор Ad5-EGFP-rIX-ER, кодирующий rIX, содержащий на С-конце последовательность спейсера и ER-домен лейциновой молнии, получен с помощью гомологичной рекомбинации в *E. coli*.

Характеристика препарата РПАН Ad5-EGFP-rIX-ER

Полученный препарат РПАН Ad5-EGFP-rIX-ER был охарактеризован по следующим параметрам: концентрация вирусных частиц в препарате, кон-

центрация бляшкообразующих частиц в препарате, термостабильность.

Концентрация препарата Ad5-EGFP-pIX-ER составила 6.5×10^{12} вирусных частиц/мл и 4.0×10^{10} БОЕ/мл. Концентрация контрольного вектора Ad5-EGFP – 6.3×10^{12} вирусных частиц/мл и 6.0×10^{10} БОЕ/мл. Полученные данные свидетельствуют о том, что внесенная в капсид аденовируса модификация не повлияла на эффективность сборки вирионов и на качество препарата, определяемое соотношением вирусных частиц и бляшкообразующих единиц (162.5 и 105 для Ad5-EGFP-pIX-ER и Ad5-EGFP соответственно).

Одна из проблем, связанная с модификацией капсидных белков Ad, – изменение стабильности получаемых РПАН. Основная функция pIX заключается в стабилизации взаимодействий между соседними гексонами [31], а внесение модификаций в pIX приводит к дестабилизации структуры капсида [32]. Поэтому мы проверили, влияет ли введение в структуру pIX ER-домена лейциновой молнии на целостность структуры вирионов, сравнивая термостабильность модифицированного Ad5-EGFP-pIX-ER вектора с немодифицированным Ad5-EGFP.

Препараты РПАН Ad5-EGFP-pIX-ER и Ad5-EGFP инкубировали при 37 и 42°C в течение 5, 15 и 30 мин, затем определяли количество инфицированных клеток (рис. 4).

Инфекционность Ad5-EGFP-pIX-ER и Ad5-EGFP сохраняется при нагревании до +37°C в течение 5, 15 и 30 мин. При этом при нагревании до +42°C через 5 мин эффективность трансдукции Ad5-EGFP-pIX-ER снижается на 32%, а через 15 мин и более приближается к 0%, в то время как инфекционность Ad5-EGFP при тех же условиях через 5 мин полностью сохранилась, а через 15 и 30 мин снизилась на 20 и 43% соответственно. Полученные нами данные показывают, что введение ER-домена лейциновой молнии в структуру pIX снижает термостабильность Ad5-EGFP-pIX-ER по сравнению с препаратом РПАН, содержащим pIX дикого типа, однако они согласуются с опубликованными данными [33, 34].

Эффективность связывания ER-домена лейциновой молнии в составе pIX РПАН с комплементарным RE-доменом лейциновой молнии на рекомбинантных наноантителах

Способность ER-лейциновой молнии в составе pIX связываться с комплементарной ей последовательностью RE-лейциновой молнии на рекомбинантных анти-РЭА определяли с помощью ИФА. Лунки 96-луночного планшета высокой сорбции сенсibilizировали aCEA-RE. После инкубации несвязавшиеся антитела отмывали и вносили Ad5-EGFP-pIX-ER.

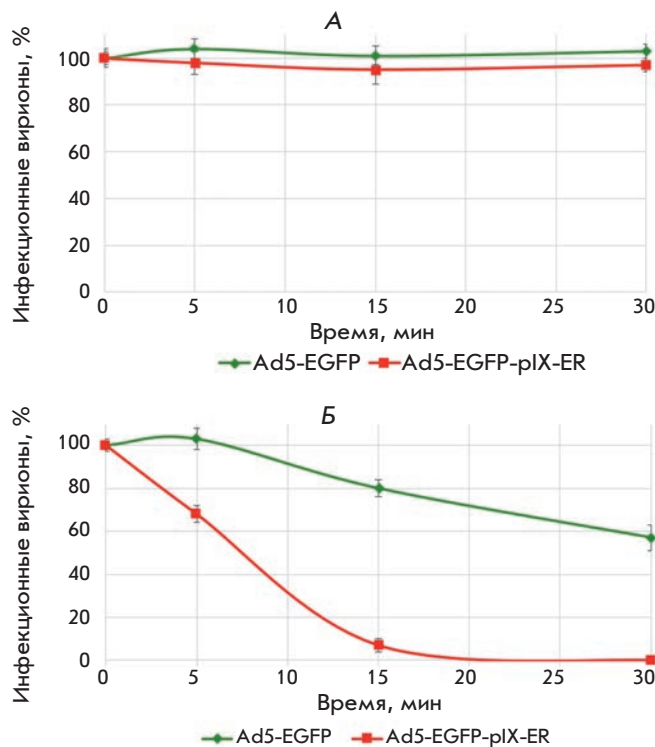


Рис. 4. Термостабильность Ad5-EGFP-pIX-ER. Препараты Ad5-EGFP-pIX-ER и Ad5-EGFP инкубировали при 37°C (А) и при 42°C (Б) в течение 5, 15 и 30 мин. Затем клетки линии HEK293 инфицировали вирусами в количестве 10^3 вирусных частиц/клетку. Через 24 ч определяли количество флуоресцирующих клеток с помощью проточной цитофлуориметрии

Несвязавшиеся с наноантителами РПАН отмывали, образование комплекса Ad5-EGFP-pIX-ER/aCEA-RE определяли с помощью анти-Ad-антител (рис. 5).

Таким образом, мы показали, что присутствие лейциновых молний в составе Ad5-EGFP-pIX-ER и наноантител позволяет специфически адсорбировать рекомбинантные наноантитела на РПАН за счет взаимодействия гидрофобных сторон ER- и RE-доменов лейциновых молний.

Выбор линий клеток, на поверхности которых экспонирован РЭА, с которым может эффективно связываться полученное наноантитело aCEA-RE

На следующем этапе работы мы определили способность наноантител aCEA-RE специфически связываться с РЭА – не только с выделенным, но и с экспонированным на клеточной поверхности.

На рис. 3Б представлен результат иммуноферментного анализа, из которого следует, что наноантитело aCEA-RE специфически связывается с иммобилизованным белком РЭА человека в концентрации

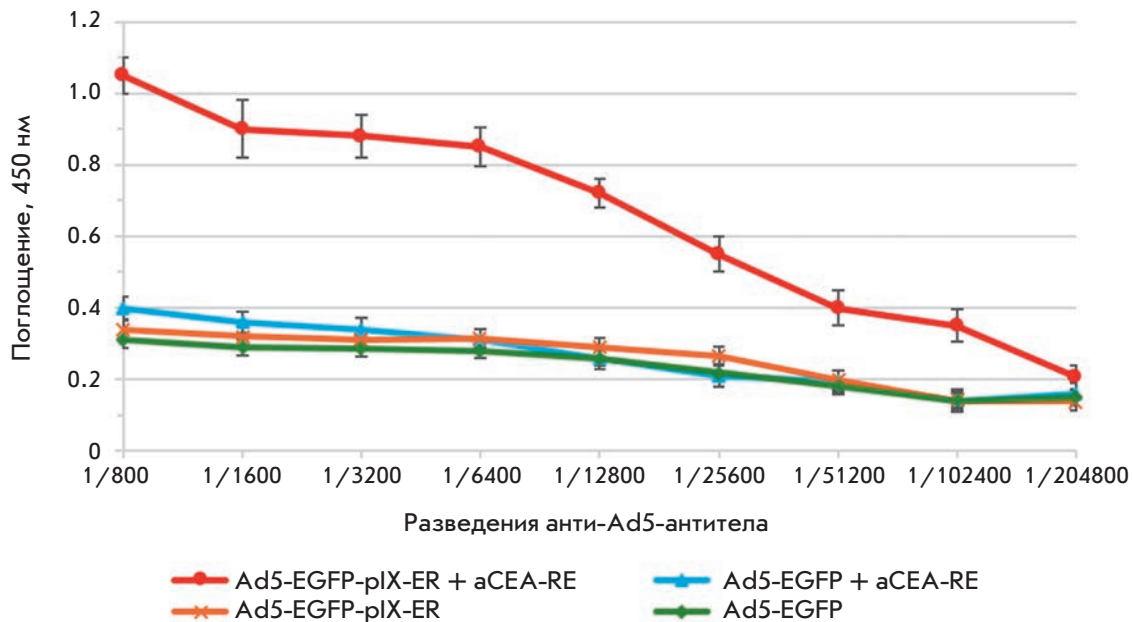


Рис. 5. Иммуноферментный анализ связывания Ad5-EGFP-pIX-ER с наноантителами aCEA-RE

100 и 10 нг/мл. В качестве контроля использовали лунки с иммобилизованным бычьим сывороточным альбумином. Интенсивность сигнала (величина поглощения $\lambda = 405$ нм) отражает эффективность связывания наноантитела.

Узнавание наноантителами изолированного РЭА еще не означает, что узнаваемый эпитоп этого белка будет доступен, когда этот белок локализуется на поверхности клетки. Возможность использования полученного наноантитела для детекции РЭА, сверхэкспрессированного на поверхности опухолевой клетки, проверяли с помощью сравнительного иммуноферментного анализа на культурах клеток линий SW480, Lim1215, A549, H1299, H460, H292, HCT-116. В качестве негативного контроля использовали клетки линий НЕК293 и CHO. На рис. 3В представлены результаты иммуноферментного анализа.

Как и в случае изолированного белка РЭА, наноантитело aCEA-RE эффективно работает в концентрации 100 нг/мл. Специфическое узнавание клеток A549 и Lim1215 связано с повышенной экспрессией РЭА, который располагается на поверхности этих клеток. Напротив, в контрольных клетках НЕК293 белок РЭА практически не экспрессируется, и этому соответствует фоновое значение оптической плотности в соответствующих ячейках. Аналогично фоновый сигнал наблюдается и в случае контрольных клеток линии яичников китайского хомячка (CHO).

В результате анализа было показано, что рекомбинантное наноантитело aCEA-RE способно специфически взаимодействовать с двумя клеточными линиями – A549 и Lim1215. Эти линии клеток использовали

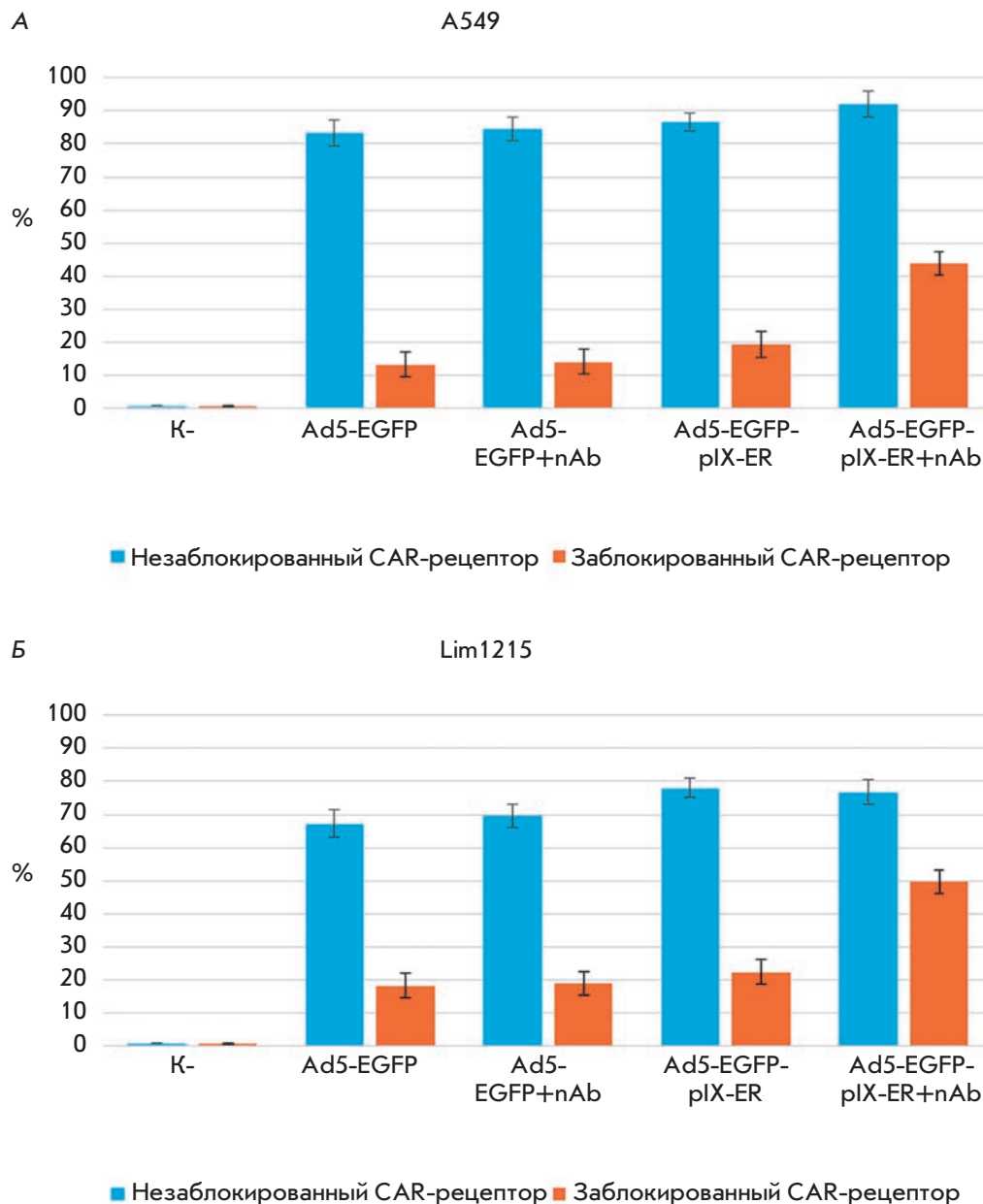
в дальнейших экспериментах по изучению эффективности трансдукции. На данный момент мы можем только предполагать, почему из семи проверенных клеточных линий только две специфически связывались с наноантителом. Это может быть обусловлено, например, с разной доступностью узнаваемого наноантителом эпитопа белка РЭА на поверхности клеток исследуемых линий, а также с потенциально возможной утратой РЭА на поверхности некоторых линий в результате бесконтрольного продолжительного культивирования.

Ad5-EGFP-pIX-ER, связанный с aCEA-RE, способен к эффективной трансдукции опухолевых клеток CAR-независимым путем

На данном этапе работы мы оценили эффективность проникновения Ad5-EGFP-pIX-ER, связанного с aCEA-RE, в опухолевые клетки. В связи с тем, что на поверхности клеток A549 и Lim1215 содержится большое количество CAR-рецепторов [35], природных рецепторов Ad5, необходимо было их заблокировать. С этой целью клеточные линии A549 и Lim1215 инкубировали с анти-CAR-антителами в концентрации 10 мг/мл, а затем трансдуцировали Ad5-EGFP-pIX-ER, предварительно «нагруженным» анти-РЭА. В качестве контроля использовали Ad5-EGFP-pIX-ER (без анти-РЭА), Ad5-EGFP, а также Ad5-EGFP, «нагруженный» анти-РЭА (рис. 6).

Было показано, что Ad5-EGFP-pIX-ER, несущий на поверхности капсида aCEA-RE, в 3 раза более эффективно трансдуцирует клетки A549 и Lim1215 в условиях заблокированных CAR-рецепторов, чем

Рис. 6. Трансдукция опухолевых клеток Ad5-EGFP-pIX-ER. Клетки линий A549 (А) и Lim1215 (Б) инкубировали с анти-CAR-антителами в концентрации 10 мг/мл в течение 30 мин при +37°C. После инкубации клетки заражали Ad5-EGFP-pIX-ER и Ad5-EGFP в дозе 500 вирусных частиц на клетку, предварительно инкубируемых в течение 30 мин при +4°C с aCEA-RE в соотношении одна вирусная частица на 240 молекул анти-тел. Количество трансдуцированных клеток определяли с помощью проточной цитофлуориметрии



препараты РПАН, не несущие на своей поверхности наноантител. Стоит отметить, что в культуре A549 только 40–60% клеток экспрессируют РЭА [36], поэтому можно предположить, что эффективность проникновения модифицированных РПАН в опухолевые клетки будет существенно больше при использовании наноантител против других опухолеспецифичных рецепторов либо других линий опухолевых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены pIX-модифицированные РПАН на основе генома Ad5, несущие на поверхности капсида лейциновые молнии. Доказана способность такого Ad5

адсорбировать на своей поверхности наноантитела, несущие комплементарную последовательность лейциновой молнии. Показано, что РПАН с лейциновыми молниями, нагруженный aCEA-RE, в 3 раза более эффективно проникает в опухолевые клетки линий A549 и Lim1215 CAR-независимым путем, чем немодифицированный препарат Ad5-EGFP и Ad5-EGFP-pIX-ER без адсорбции наноантител на поверхности капсида.

Таким образом, опираясь на результаты нашей работы, можно полагать, что полученный нами вектор Ad5-EGFP-pIX-ER можно использовать в качестве универсальной платформы, которая посредством

специфического присоединения к поверхности РПАН молекул наноантител против определенного (опухолеспецифичного) поверхностного антигена может обеспечить доставку целевого гена в заданные (опухолевые) клетки. Вместо наноантител в принципе может быть использован любой другой соответственно адаптированный белок, обладающий свойством специфического узнавания интересующей исследователя мишени. ●

Работа выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (соглашение № 8779), а также частично поддержана программой фундаментальных исследований Президиума РАН № 24 «Фундаментальные основы технологий наноструктур и наноматериалов» (грант С.В.Т.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bonnekoh B., Greenhalgh D.A., Chen S.H., Block A., Rich S.S., Krieg T., Woo S.L., Roop D.R. // *J. Invest. Dermatol.* 1998. V. 110. № 6. P. 867–871.
- Benihoud K., Yeh P., Perricaudet M. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999. V. 10. № 5. P. 440–447.
- The Journal of Gene Medicine. Clinical Trials Database. <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>
- Zhang Y., Bergelson J.M. // *J. Virol.* 2005. V. 79. № 19. P. 12125–12131.
- Vindrieux D., Le Corre L., Hsieh T.J., Metivier R., Escobar P., Caicedo A., Brigitte M., Lazennec G. // *Endocr. Relat. Cancer.* 2011. V. 18. № 3. P. 311–321.
- Sakurai F., Mizuguchi H., Yamaguchi T., Hayakawa T. // *Mol. Ther.* 2003. V. 8. № 5. P. 813–821.
- Breidenbach M., Rein D.T., Everts M., Glasgow J.N., Wang M., Passineau M.J. // *Gene Therapy.* 2005. V. 12. № 5. P. 187–193.
- Korokhov N., Mikheeva G., Krendelshchikov A., Belousova N., Simonenko V., Krendelshchikova V., Pereboev A., Kotov A., Kotova O., et al. // *J. Virol.* 2003. V. 77. № 24. P. 12931–12940.
- Terao S., Acharya B., Suzuki T., Aoi T., Naoe M., Hamada K., Mizuguchi H., Gotoh A. // *Anticancer Res.* 2009. V. 29. № 8. P. 2997–3001.
- Hiwasa K., Nagaya H., Terao S., Acharya B., Hamada K., Mizuguchi H., Gotoh A. // *Anticancer Res.* 2012. V. 32. № 8. P. 3137–3140.
- Hongju W., Han T., Belousova N., Krasnykh V., Kashentseva E., Dmitriev I., Kataram M., Mahasreshni P.J., Curiel D.T. // *J. Virol.* 2005. V. 79. № 6. P. 3382–3390.
- Vigne E., Mahfouz I., Dedieu J.F., Brie A., Perricaudet M., Yeh P. // *J. Virol.* 1999. V. 73. № 6. P. 5156–5161.
- Dmitriev I.P., Kashentseva E.A., Curiel D.T. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 14. P. 6893–6899.
- Vellinga J., van der Heijdt S., Hoeben R.C. // *J. Gen. Virol.* 2005. V. 86. № 6. P. 1581–1588.
- Davison E., Diaz R.M., Hart I.R., Santis G., Marshall J.F. // *J. Virol.* 1997. V. 71. № 80. P. 6204–6207.
- Iyer S.V., Davis D.L., Seal S.N., Burch J.B. // *Mol. Cell. Biol.* 1991. V. 11. № 10. P. 4863–4875.
- Möll J.R., Ruvini S.B., Pastan I., Vinson C. // *Protein Sci.* 2001. V. 10. P. 649–655.
- Glasgow J.N., Mikheeva G., Krasnykh V., Curiel D.T. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 12. P. 8355.
- Тиллиб С.В. // *Молекуляр. биология.* 2011. Т. 45. № 1. С. 77–85.
- Tillib S., Ivanova T.I., Vasilev L.A., Rutovskaya M.V., Saakyan S.A., Gribova I.Y., Tutykhina I.L., Sedova E.S., Lysenko A.A., Shmarov M.M., et al. // *Antiviral Res.* 2013. V. 97. P. 245–254.
- Грибова И.Ю., Тиллиб С.В., Тutykhina И.Л., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Верховская Л.В., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. // *Acta Naturae.* 2011. Т. 3. № 3(10). С. 66–72.
- Tutykhina I., Sedova E., Gribova I., Ivanova T.I., Vasilev L.A., Rutovskaya M.V., Lysenko A., Shmarov M., Logunov D., Naroditsky B., et al. // *Antiviral Res.* 2013. V. 97. № 3. P. 318–328.
- Shmarov M.M., Cherenova L.V., Shashkova E.V., Logunov D.U., Verkhovskaia L.V., Kapitonov A.V., Neugodova G.L., Dronin K.K., Naroditskiĭ B.S. // *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 2002. V. 2. P. 30–35.
- Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., Bendahman N., Hamers R. // *Nature.* 1993. V. 363. P. 446–448.
- Nguyen V.K., Desmyter A., Muyldermans S. // *Adv. Immunol.* 2001. V. 79. P. 261–296.
- Saerens D., Kinne J., Bosmans E., Wernery U., Muyldermans S., Conrath K. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 51965–51972.
- Rothbauer U., Zolghadr K., Tillib S., Nowak D., Schermelleh L., Gahl A., Backmann N., Conrath K., Muyldermans S., Cardoso M.C., et al. // *Nat. Methods.* 2006. V. 3. № 11. P. 887–889.
- Тиллиб С.В., Иванова Т.И., Васильев Л.А. Фингерпринтный анализ селекции «наноантител» методом фагового дисплея с использованием двух вариантов фагов-помощников. // *Acta Naturae.* 2010. Т. 2. № 3(6). С. 100–108.
- Ghosh-Choudhury G., Haj-Ahmad Y., Graham F.L. // *EMBO J.* 1987. V. 6. № 6. P. 1733–1739.
- Vellinga J., Rabelink M.J., Cramer S.J., van den Wollenberg D.J., van der Meulen H., Leppard K.N., Fallaux F.J., Hoeben R.C. // *J. Virol.* 2004. V. 78. № 7. P. 3470–3479.
- Boulanger P., Lemay P., Blair G.E., Russell W.C. // *J. Gen. Virol.* 1979. V. 44. № 3. P. 783–800.
- Mathis J.M., Bhatia S., Khandelwal A., Kovesdi I., Lokitz S.J., Odaka Y., Takalkar A.M., Terry T., Curiel D.T. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 2. P. 16792.
- Campos S.K., Parrott M.B., Barry M.A. // *Mol. Ther.* 2004. V. 9. № 6. P. 942–954.
- Tang Y., Le L.P., Matthews Q.L., Han T., Wu H., Curiel D.T. // *Virology.* 2008. V. 377. № 2. P. 391–400.
- Davison E., Kirby I., Whitehouse J., Hart I., Marshall J.F., Santis G. // *J. Gene Med.* 2001. V. 3. № 6. P. 550–559.
- Simpson H.D., Barras F. // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. № 15. P. 4611–4616.