

УДК 577.112.083:571.27

Рекомбинантные биспецифические антитела к рецептору ErbB2 и интерферону- β человека

А. А. Панина^{1*}, В. С. Рыбченко¹, О. Н. Солопова^{3,4}, Д. С. Балабашин¹, С. А. Якимов¹, Т. К. Алиев², Д. А. Долгих¹, П. Г. Свешников³, М. П. Кирпичников^{1,5}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

³Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва, 117149 Россия

⁴Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115478 Россия

⁵Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия

*E-mail: paniann07@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.03.2020

Принята к печати 23.04.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10903

РЕФЕРАТ Создание и исследование новых средств, способных избирательно и эффективно уничтожать опухолевые клетки, сверхэкспрессирующие рецептор эпидермального фактора роста ErbB2, представляют актуальную задачу. За последнее время возрос интерес к использованию интерферонов типа I в терапии онкологических заболеваний. Цитокиновая терапия направлена на активацию клеток иммунной системы для борьбы с опухолями. Однако применение цитокиновой терапии сдерживается ее побочными эффектами, тяжесть которых варьирует в зависимости от дозы и типа используемого цитокина. Поэтому изучается возможность уменьшения системного действия интерферона- β , применяемого в терапии опухолей. Мы разрабатываем иммуноцитоклиновый комплекс биспецифического антитела к ErbB2 и рекомбинантного интерферона- β , который позволит избежать системного действия этого цитокина. С этой целью нами созданы полноразмерные антитела, связывающие, с одной стороны, ErbB2, а с другой – связывающие и нейтрализующие интерферон- β , что позволяет рассматривать их как средство доставки цитокина к опухолевым клеткам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биспецифические антитела, CrossMab, интерферон- β , ErbB2, иммуноцитоклиновый комплекс.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ErbB2 – рецептор эпидермального фактора роста; ИФН β – интерферон- β человека; Tz – трастузумаб; mAb – моноклональные антитела; BsAb – биспецифические антитела; L и H – легкая и тяжелая цепи антитела соответственно; VL и VH – вариабельные домены легкой и тяжелой цепей антител; C_H1–C_H3 – константные домены тяжелой цепи антитела; SOE-PCR – ПЦР с перекрывающимися областями; EC₅₀ – полумаксимальная эффективная концентрация; PBS – фосфатно-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы является основной причиной онкологической смертности среди женщин. Он составляет почти 11% от числа всех онкологических заболеваний и занимает первое место в мире по распространенности. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения России в 2017 г. рак молочной железы составил 21.1%, число пациенток с I–II стадиями заболевания составило 69.9% [1]. В значительной части опухолей

выявлена сверхэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста ErbB2. Амплификация и/или сверхэкспрессия ErbB2 наблюдается в 20–34% случаев инвазивного рака молочной железы [2, 3], она ассоциирована с повышенной клеточной пролиферацией, усиленным ангиогенезом, сниженным апоптозом опухолевых клеток и, как следствие, с высоким потенциалом метастазирования [4, 5]. Сверхэкспрессия ErbB2 считается независимым прогностическим фактором повышенного риска рецидива заболева-

ния. В случае ErbB2-положительного рака молочной железы I–II стадии риск местного рецидивирования в 2.7 раза, а риск отдаленного метастазирования — в 5.3 раза выше, чем ErbB2-отрицательного [2]. Кроме того, ErbB2 может сверхэкспрессироваться на опухолях мочевого пузыря, поджелудочной железы, яичника, матки, толстой кишки, почки, головы и шеи, желудка, пищевода и предстательной железы [6]. Сверхэкспрессию HER2 выявляют преимущественно при злокачественных новообразованиях эпителиального происхождения [7]. Статус гена *HER2/neu* (ErbB2) является одним из основных показателей, используемых для идентификации подтипов опухолей молочной железы, прогноза заболевания и выбора методов лечения пациентов. Таким образом, взаимосвязь между сверхэкспрессией и/или амплификацией ErbB2 и плохим клиническим прогнозом дает основание рассматривать ErbB2 как важное звено в молекулярно-биологической классификации рака молочной железы, а также как важную терапевтическую мишень. В настоящее время имеются препараты, действие которых направлено на ErbB2. Прорыв в противоопухолевой терапии произошел благодаря появлению препарата Герцептин (трастузумаб), представляющего собой гуманизированное антитело к внеклеточному домену ErbB2 [8–10], которое подавляет пролиферацию опухолевых клеток. Эффективность трастузумаба в случае монотерапии ранее леченных больных метастатическим ErbB2-положительным раком молочной железы составляет 26–35%, а больных, не получавших ранее терапии по поводу диссеминации процесса – 12–15% [11]. В настоящее время трастузумаб в комбинации с химиотерапией считается основным препаратом при ErbB2-положительном раке молочной железы [12]. Однако в ряде случаев наблюдается резистентность к этому препарату. Поэтому поиск новых путей терапии ErbB2-позитивных опухолей остается важным направлением исследований.

Интерферон-β человека (ИФНβ) – иммуномодуляторный цитокин, обладающий антивирусной, антипролиферативной, проапоптотической и антиангиогенной активностью. Эффективность антипролиферативного и апоптотического действия интерферонов варьирует в зависимости от типа опухолевых клеток, однако ИФНβ считается более эффективным, чем ИФН α и ИФН γ , например, в случае ингибирования гепатоклеточной карциномы [13], глиомы [14], опухолей поджелудочной [15] и молочной железы [12, 16]. ИФНβ стимулирует остановку опухолевых клеток в фазах S-G2-M клеточного цикла, а также стимулирует в них апоптоз [15]. Кроме того, в экспериментальных исследованиях показано, что ИФНβ индуцирует экспрессию молекул главно-

го комплекса гистосовместимости класса I (МНС-I), что рассматривается как один из универсальных механизмов усиления противоопухолевого ответа за счет T-клеточной цитотоксичности [17]. Подробно механизм действия интерферонов типа I (ИФН α и ИФН β), а также современные представления о применении интерферонов в терапии рака рассмотрены в обзоре [18].

Потенциально перспективная и привлекательная цитокиновая терапия направлена на активацию клеток иммунной системы для борьбы с опухолями, однако ее применение сдерживается возникновением побочных эффектов, тяжесть которых варьирует в зависимости от дозы и типа цитокина. В настоящее время изучают возможность уменьшения системного действия ИФН β при его применении в терапии опухолей. В большинстве этих исследований используют вирусные векторы, несущие ген ИФН β . В ряде работ показано, что интерфероны типа I, конъюгированные с моноклональными антителами к белкам, ассоциированным с опухолевыми клетками, могут индуцировать антипролиферативный эффект, вызванный как конъюгированным интерфероном, так и антителами [19–23]. Би- и мультиспецифические производные антител можно рассматривать как следующее и очень многообещающее поколение биологических препаратов для направленной терапии рака. Общая концепция таких антител представляет собой объединение двух рекомбинантных антител с различными специфичностями, т.е. реагирующими, по меньшей мере, с двумя антигенами или эпитопами.

Мы планируем создать иммуноцитоклиновый комплекс, в котором одна из частей биспецифического антитела должна связывать ИФН β и нейтрализовать его действие, вторая должна быть способна связывать рецептор ErbB2 на поверхности опухолевой клетки. Предполагается, что в местах локализации опухоли и метастатических узлов будет достигнуто локальное накопление ИФН β , что приведет к отсутствию нежелательных системных реакций, обуславливающих клиническую картину побочных эффектов, характерных для ИФН β как монопрепарата.

Цель нашей работы состояла в создании на основе полученных ранее рекомбинантных химерных нейтрализующих мАТ к ИФН β [24] и антитела к ErbB2 биспецифических полноразмерных антител как компонента иммуноцитоклинового комплекса с ИФН β , предназначенного для терапии ErbB2-позитивных опухолей, а также изучение их биохимических и иммунохимических свойств.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали линию клеток аденокарциномы яичников человека SKOV3-ErbB2 (ATCC® HTB-

77[™]), экспрессирующую ErbB2; линию клеток аденокарциномы толстой кишки человека HT29 (ATCC® HTB-38[™]) с низким уровнем экспрессии или не экспрессирующую ErbB2c и линию клеток аденокарциномы яичников человека SKOV3, утратившую сверхэкспрессию ErbB2.

Использовали фармацевтическую субстанцию гликозилированного ИФНβ 1a производства ООО «Фармапарк»; аптечный препарат ИФНβ 1b «Бетаферон»; нитроцеллюлозную мембрану (нитроцеллюлозные мембранные фильтры с размером пор 0.45 мкм, S045A330R), Advantec MFS, Inc., США; мембрану Vivaflow 200, Sartorius Stedim Biotech, Германия; 96-луночные планшеты с высокой связывающей способностью (Corning-Costar, Нидерланды); Твин 20.

Получение нуклеотидных последовательностей, кодирующих L- и H-цепи антитела к ErbB2b человека с мутациями knob* и hole

Нуклеотидные последовательности, кодирующие VL- и VH-антитела к ErbB2, синтезированы химико-ферментативным путем из перекрывающихся олигонуклеотидов на основе аминокислотных последовательностей антитела трастузумаб [25] с учетом оптимизации частоты встречаемости кодонов в геноме китайского хомячка. На 5'-концы последовательностей VL- и VH-антител поместили последовательность Козак и последовательности лидерных пептидов для секреции антител в культуральную жидкость. Также для последующей состыковки последовательностей VL- и каппа-домена, VH- и константных доменов C_H1-C_H3 на 3'-конец последовательностей V-доменов вводили участки, комплементарные 5'-части константных доменов. VH- и VL-последовательности объединяли с помощью SOE-PCR. Мутации knob-type* и hole-type вводили в CH3-домен H-цепи с использованием мутагенизирующих праймеров.

Получение последовательностей, кодирующих L- и H-цепи антитела B16, нейтрализующего ИФНβ, с кроссовером

Для получения генов антител с кроссоверами в последовательности VL- и VH-антител с помощью ПЦР вводили дополнительные последовательности. Дизайн праймеров планировали исходя из VL- и VH-последовательностей. Для получения гена L-цепи, содержащего кроссовер, на 5'-конец последовательности VL-цепи вводили «локтевой» участок и небольшой фрагмент последовательности H-цепи, содержащий сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции Bsp120I. После этого в последовательность VH-цепи антитела B16 с помощью ПЦР вводили участок, пе-

рекрывающийся с последовательностью константного домена L-цепи каппа. Последовательность каппа-домена состыковывали с модифицированными VH-доменами с помощью SOE-PCR.

Для получения гена H-цепи, содержащего кроссовер, на 3'-конец последовательности VL-цепи вводили последовательность, содержащую часть последовательности C_H1-домена H-цепи, а также сайт рестрикции Bsp120I. После чего полученные последовательности клонировали по сайтам рестрикции NheI и Bsp120I в экспрессионный вектор, который получали рестрикцией по сайтам NheI и Bsp120I плазмиды, содержащей ген H-цепи антитела к ErbB2 с мутацией knob-type*.

Конструирование бицистронных экспрессионных плазмид, содержащих гены антитела B16 с кроссовером и мутациями KiH-star

Бицистронные экспрессионные векторы получали путем лигирования в плазмиды, содержащие ген L-цепи, последовательность IRES-элемента и гена H-цепи. Такой вектор получали для каждой составляющей биспецифического антитела. Последовательность IRES-элемента, фланкированную сайтами рестрикции BamHI и NheI, после обработки рестриктазами BamHI и NheI и выделения фрагмента размером 630 п.н. из 1% агарозного геля, лигировали с векторной частью, содержащей ген L-цепи антител с кроссовером (BamHI-XhoI) и фрагментом, содержащим ген H-цепи с кроссовером и мутациями knob-type*.

Получение экспериментальных образцов биспецифических антител

Для наработки тест-образца антител использовали метод транзientной экспрессии. За 24 ч до трансфекции CHO-клетки пересеивали в концентрации 4×10^6 клеток/мл в колбу Эрленмейера, содержащую 30 мл культуральной среды CD OptiCHO (Invitrogen, США), дополненную 8 мМ L-глутамин (Invitrogen), 0.1% Pluronic F68 (Gibco, США). Трансфекцию клеток проводили с использованием липофектамина (Invitrogen) согласно рекомендациям производителя и пар бицистронных векторов, содержащих гены L- и H-цепей антитела Tz и антитела B16. Для трансфекции использовали 18 мкг ДНК и 15 мкл трансфектанта FreeStyle MAX (Invitrogen). Культивирование продолжали в течение 10–14 сут при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 8% CO₂, при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере ELMi S3.20L со скоростью 130 об/мин до снижения количества живых клеток в культуре до уровня 0.3×10^6 клеток/мл. Для получения необходимых количеств белка трансфекцию выполняли

в шести колбах для каждой из пар плазмид. После завершения культивирования клетки осаждали центрифугированием при скорости вращения 1200 об/мин в течение 10 мин, затем супернатант, содержащий антитела, центрифугировали в течение 15 мин при скорости вращения 4000 об/мин, раствор антител стерилизовали фильтрованием через мембрану с размером пор 0.22 мкм. До выделения антител супернатант хранили при 4°C.

Выделение БсАт с помощью аффинной хроматографии

Образцы культуральной жидкости диализовали против PBS и концентрировали для дальнейшей очистки на хроматографической колонке MabSelect SuRe LX Protein A Resin (GE Healthcare) объемом 5 мл. Антитела выделяли по протоколу, предложенному производителем. После очистки на аффинной колонке и при необходимости концентрирования образца проводили гель-фильтрационное хроматографирование в аналитическом режиме на носителе Superdex 200-10/300 GL для того, чтобы установить наличие и соотношение мономерных и олигомерных форм антител. Концентрацию целевых белков определяли спектрофотометрически с использованием NanoPhotometer P300 (IMPLEN, Германия).

Непрямой иммуноферментный анализ (ИФА)

Способность полученных белков взаимодействовать с ИФН β или рекомбинантным внеклеточным доменом E γ bV2 определяли с использованием непрямого ИФА. Антигены в буфере PBS (0.5 мкг/мл) сорбировали на планшет, блокировали 5% раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS и промывали. Затем добавляли исследуемые белки, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, промывали раствором 0.05% Твин 20 в PBS. После промывки добавляли конъюгат моноклонального антитела 4G7 к каппа-домену легкой цепи Ig человека (ООО «Биалекса», Россия) с пероксидазой хрена в разведении 1 : 75000, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, промывали раствором 0.05% Твин 20 в PBS и добавляли проявляющий субстрат (тетраметилбензидин). После развития окраски реакцию останавливали, добавляя 10% серной кислоты. Измеряли оптическое поглощение при 450 нм.

Иммуноблоттинг интерферона- β человека, гликозилированного и негликозилированного, с использованием биспецифических антител

После электрофоретического разделения препаратов ИФН β в 15% ПААГ в невосстанавливающих условиях осуществляли электроблоттинг белков на нитроцеллюлозную мембрану (размер пор 0.45 мкм,

Advantec MFS, Inc., США). Перенесенные белки выявляли с помощью непрямого ИФА (иммуноблоттинг) после блокировки 5% казеином в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере и отмывки PBS-T (10 мМ K_2HPO_4 , pH 7.5, 0.145 М NaCl, 0.05% Твин 20). Мембрану разрезали на полоски и помещали в растворы антител (5 мкг/мл), инкубировали в течение 1 ч на шейкере при комнатной температуре. После трехкратной промывки инкубировали с антивидовым пероксидазным конъюгатом мАТ 4G7 против каппа-цепи Ig человека в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере. После повторной трехкратной промывки в PBS-T и окончательной однократной промывки в PBS добавляли субстрат (3,3-диаминобензидин, 4-хлор-1-нафтол и пероксид водорода), инкубировали в течение 10 мин и останавливали реакцию, промывая полоски водой.

Непрямой ИФА с использованием клеточных лизатов

Для приготовления лизатов культуральные флаконы или чашки Петри помещали на лед, промывали 1 раз холодным PBS, затем снимали клетки при помощи культурального скребка. Клеточный осадок дважды промывали холодным PBS, центрифугируя со скоростью 2000 об/мин при 4°C в течение 10 мин. Клеточный осадок лизировали буфером RIPA с добавлением ингибиторов протеаз 1 мМ PMSF и 1 мМ апротинина. Состав буфера RIPA: 20 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 1 мМ Na_2EDTA , 1 мМ EGTA, 1% NP-40, 1% дезоксихолат натрия, 2.5 мМ пиродифосфат натрия, 1 мМ β -глицерофосфат, 1 мМ Na_3VO_4 , 1 мкг/мл леупептина. Осадок обрабатывали ультразвуком для наиболее полной экстракции мембранных белков, затем центрифугировали в течение 10 мин при 12000 об/мин и температуре 4°C. Супернатанты отбирали, измеряли в них концентрацию белка, аликвоты супернатантов хранили при -20°C. Для проведения ИФА использовали процедуру, описанную выше, с некоторыми вариациями. Клеточные лизаты сорбировали на планшет в концентрации 10 мкг/мл в PBS (0.01 М KH_2PO_4 , 0.1 М NaCl), pH 7.2-7.4 по 50 мкл в лунки 96-луночного планшета для ИФА в течение ночи при 4°C. Планшет трижды отмывали PBS-T (0.1% Твин 20) по 200 мкл в лунку. Образцы БсАт титровали от 800 нг/мл с шагом 2 в PBS-AT (0.01 М KH_2PO_4 , 0.1 М NaCl, 0.2% BSA, 0.1% Твин 20). Планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Отмывки, реакцию с конъюгатом, проявление и измерение оптического поглощения проводили как описано выше. В качестве положительного контроля использовали антитело трастузумаб (Герцептин) в концентрации 10 мкг/мл.

Определение одновременного связывания интерферона- β и ErbB2 методом сэндвич-ИФА

Биспецифический характер связывания полученного антитела подтверждали с помощью сэндвич-ИФА в двух вариантах. В первом варианте на твердую фазу сорбировали ИФН β (1 мкг/мл) в количестве 100 мкл/лунку, затем после блокировки инкубировали с БсАт (1 мкг/мл) в 3-кратных серийных разведениях. После отмывки несвязавшихся антител добавляли биотинилированный рекомбинантный ErbB2 (200 нг/мл) и конъюгат авидин-пероксидаза хрена (150 нг/мл). Во втором варианте на твердую фазу сорбировали рекомбинантный внеклеточный домен ErbB2 (200 нг/мл), затем БсАт (также в серийных разведениях), биотинилированный ИФН β (250 нг/мл) и конъюгат авидин-пероксидаза хрена (150 нг/мл). В качестве контроля использовали полноразмерное антитело V16 к ИФН β , моноспецифические антитела к ErbB2: аптечный препарат Герцептин и полученное нами рекомбинантное антитело трастузумаб (аналог Герцептина).

Определение нейтрализующей активности БсАт

Для анализа использовали клеточную линию аденокарциномы толстой кишки HT29 человека, не экспрессирующую ErbB2. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МПК) выделяли из цельной крови здорового донора в градиенте фиколла-1077 по методике [26]. Готовили серийные разведения БсАт, а также контрольных антител: мышинного антитела V16, химерного и гуманизированного антител на основе V16, нейтрализующих ИФН β (положительный контроль). К антителам добавляли рекомбинантный гликозилированный ИФН β производства ООО «Фармапарк» в концентрации 3 нг/мл. Все растворы готовили в полной ростовой среде с 2% сывороткой крупного рогатого скота. Опухолевые клетки культивировали в течение 5 сут в смеси с МПК в присутствии ИФН β и антител в различных концентрациях. Конечные концентрации активных веществ и клеток составили: антитела – от 0 до 100 мкг/мл; ИФН β – 1 нг/мл (0 в контрольных лунках); МПК – 50×10^3 клеток/лунку; опухоли: 3000 клеток/лунку. Количество живых клеток оценивали в тесте МТТ [27]. Каждое измерение проводили в четырех повторениях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование биспецифических антител и их экспрессия

При совместной экспрессии двух разных генов тяжелых цепей иммуноглобулинов (H_1 и H_2) могут образовываться три вида димеров тяжелых цепей: H_1-H_1 , H_2-H_2 и H_1-H_2 . При этом H_1-H_1 и H_2-H_2 являются

частью моноспецифических антител, а H_1-H_2 – биспецифических. При одинаковой эффективности образования димеров максимально возможный выход БсАт составляет 50% от всего количества продуцируемых иммуноглобулинов. Для увеличения продукции БсАт можно ввести мутации, увеличивающие свободную энергию образования моноспецифических антител. Такой подход делает энергетически более выгодным образование БсАт, что должно привести к увеличению продукции БсАт по сравнению с моноспецифическими антителами. Одним из возможных подходов является создание мутаций, известных как knob-into-hole [28]. При таком подходе в СН3-домен Н-цепи одного антитела вводят мутацию Т366W, а в СН3-домен Н-цепи другого антитела – мутации Т366S, L3638A, Y407V. Мутация Т366W приводит к появлению большого гидрофобного основания на поверхности интерфейса образования димера СН3-доменов Н-цепей. Эта мутация в дальнейшем будет обозначаться как knob-type. Мутации Т366S, L3638A, Y407V приводят к образованию стерически комплементарного для Т366W углубления (hole-type). Для облегчения очистки БсАт с помощью аффинной хроматографии в СН3-домен Н-цепи, содержащей мутации knob-type, вводят мутации H457R, Y458F. Такие мутации изменяют константу образования комплекса антитела с белком А стафилококка, что делает возможным разделение смеси биспецифического и моноспецифических антител при элюции буфером с градиентом рН с аффинного носителя [29]. В дальнейшем мутации H457R, Y458F будут обозначаться как «star», либо «*».

Для того чтобы предотвратить неправильное спаривание L- и Н-цепей, относящихся к разным антителам, Schaefer W. и соавт. [30] предложено элегантное решение, названное «кроссовером» вариабельных доменов антител. VL-домен антитела присоединяется к СН1-домену Н-цепи, а VH-домен – к капша-домену L-цепи в так называемом «локтевом» участке (рис. 1). Более подробно аминокислотные последовательности в участке, соответствующем кроссоверу, описаны в [30].

В нашей работе кроссовер спланирован для части БсАт, соответствующей антителу V16, нейтрализующему ИФН β . Мутации типа hole поместили в Н-цепь, соответствующую антителу к ErbB2, мутации типа knob* находятся в Н-цепи антитела V16. Это делает возможным преимущественное связывание Н-цепей в виде пар knob-hole, тем самым обеспечивая образование биспецифического антитела. Схематически структура биспецифического антитела с кроссовером вариабельных доменов, мутациями в СН3-доме Н-цепи knob*-hole и мутациями, уменьшающими связывание с белок-А-сефарозой, представлена на рис. 2.

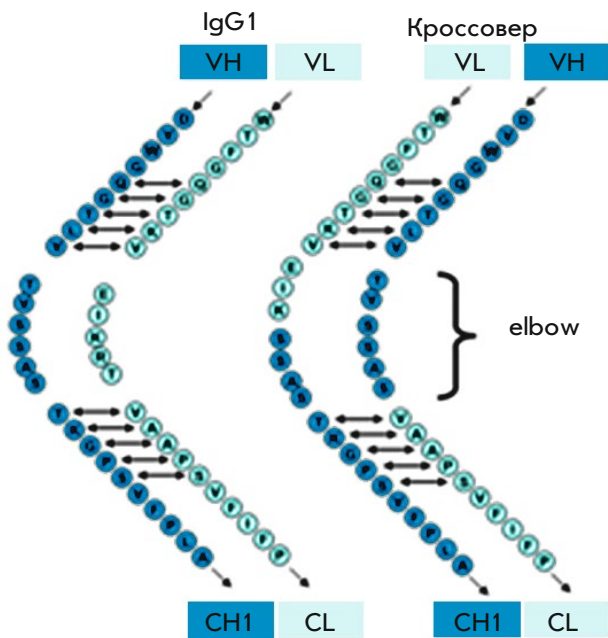


Рис. 1. Схематическое изображение кроссовера аминокислотных последовательностей переменных доменов H- и L-цепей антитела («локтевой» участок) [30]

Для одновременного получения четырех цепей – L и H антитела к ErbB2 и L и H к ИФНβ – использовали бицистронные векторы, в которых гены тяжелой и легкой цепей каждого антитела экспрессировались под контролем одного промотора. В качестве экспрессионного вектора для получения БсАт в клетках эукариот была выбрана плазмида pcDNA3.4 Poly40 (собственная модификация вектора pcDNA3.4 Invitrogen со встроенным полилинкером). Эта плазмида имеет среднеранний цитомегаловирусный промотор-энхансер для обеспечения биосинтеза целевого белка. Исходя из результатов наших предшествующих исследований, после промотора сначала был помещен ген L-цепи антитела, затем после регуляторного элемента IRES ген H-цепи. В качестве регуляторного элемента для обеспечения экспрессии гена H-цепи антитела использован внутренний сайт посадки рибосом IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV) (рис. 3).

Получены два таких вектора, в одном из которых клонированы последовательно, кодирующие L-цепь и H-цепь с мутациями типа hole антитела трастузумаб, в другом – L-цепь и H-цепь с мутациями типа knob* антитела к ИФНβ-1а человека в формате кроссовер. Для облегчения очистки биспецифического антитела с помощью аффинной хроматографии в кодирующую последовательность CH3-домена гена H-цепи, содержащей мутации knob-типе, вводили мутации H457R, Y458F. Сочетания двух векторов использовали для транзientной экспрессии в клетках млекопитающих,

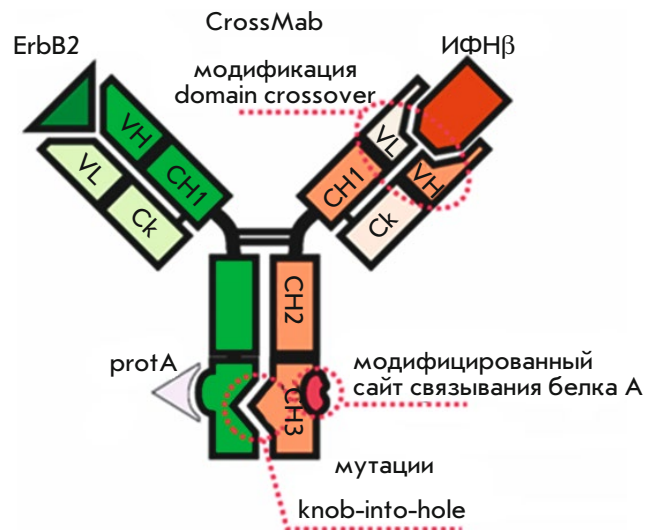


Рис. 2. Структура биспецифического антитела с кроссовером переменных доменов в части, относящейся к связыванию с ИФНβ, с мутациями knob-hole и мутациями, уменьшающими связывание с белком A *Staphylococcus aureus*

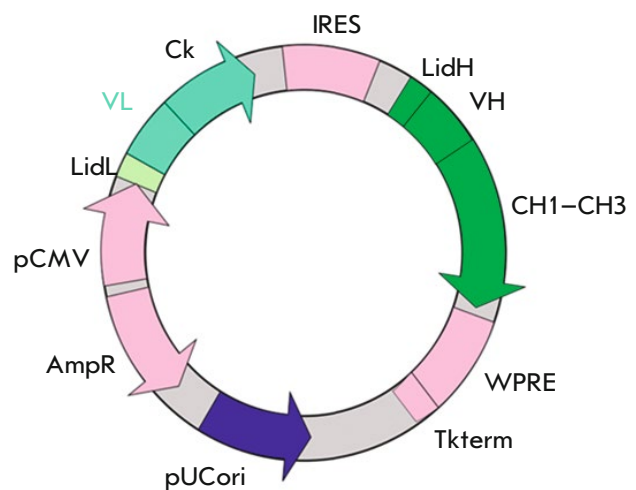


Рис. 3. Схема бицистронного вектора для экспрессии БсАт. pCMV – промотор цитомегаловируса; VH и VL – гены переменных доменов антител; CH1–CH3 – последовательности, кодирующие константные домены H-цепи антитела; IRES – участок внутренней посадки рибосомы; WPRE – последовательность регуляторного элемента; Tkterm – сигнальная последовательность полиаденилирования мРНК тимидинкиназы вируса простого герпеса

что позволяет получить биспецифические антитела к двум разным антигенам.

Антитела нарабатывали с использованием системы транзientной экспрессии. Транзientная система экспрессии в CHO-клетках позволяет получать за короткий промежуток времени рекомбинантные антитела в количестве, достаточном для иммунохимиче-

ского анализа, определения аффинности и изучения нейтрализующей активности. При этом белки имеют правильную пространственную укладку и правильно гликозилированы. После очистки на аффинной колонке с белок-А-сефарозой проводили гель-фильтрацию в аналитическом режиме на носителе Superdex 200-10/300 GL, чтобы выявить антитела и определить соотношение их мономерных и олигомерных форм. С помощью аналитической ВЭЖХ показано, что введение второй хроматографической стадии позволяет повысить уровень чистоты препаратов рекомбинантных антител до 96–98% и провести очистку от агрегатных форм рекомбинантных антител (рис. 4А).

Чистоту и гомогенность БсАт подтверждали с помощью электрофореза по Лэммли [31] в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с последующей денситометрией электрофореграммы (рис. 4Б). По результатам денситометрии чистота БсАт составила $97.8 \pm 1.0\%$.

Исследование БсАт иммунохимическими методами

Связывание БсАт с ИФНβ. Связывание БсАт с гликозилированной и негликозилированной формами ИФНβ тестировали методом непрямого ИФА. Установлено, что как гликозилированная (ИФНβ-1а), так и негликозилированная (ИФНβ-1б) формы ИФНβ, сорбированного на твердой фазе, связываются с БсАт (рис. 5). Характер связывания БсАт с ИФНβ оказался сходным с характером связывания мышинового антитела V16, прототипного для получения БсАт.

Связывание БсАт с ИФНβ было проверено также методом иммуноблоттинга (вестерн-блоттинга). Этот метод позволяет визуализировать иммунные комплексы антиген-антитело после электрофоретического разделения препарата антигена в денатурирующих условиях с последующим переносом на мембрану. Главное отличие иммуноблоттинга от непрямого ИФА заключается в возможности дискриминировать иммунные комплексы с различной молекулярной массой, например, мономерные и олигомерные формы антигена, а так-

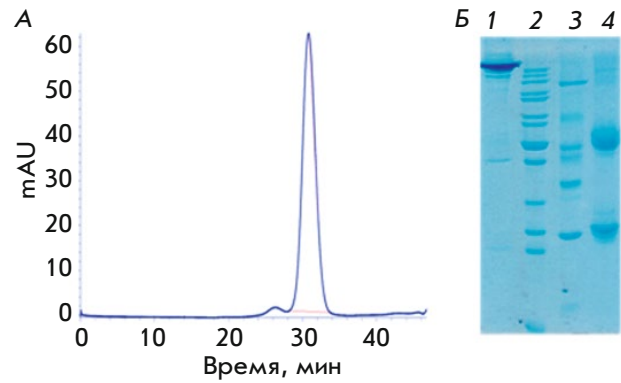


Рис. 4. Хроматограмма БсАт V16 формата CrossMab (А). Электрофореграмма БсАт V16 в 12% SDS-ПААГ (Б): 1 – в невосстанавливающих условиях, 4 – в восстанавливающих условиях, 2, 3 – стандарты молекулярных масс: 2 – 200.0, 150.0, 120.0, 100.0, 85.0, 70.0, 60.0, 50.0, 40.0, 30.0, 25.0, 14.4 кДа; 3 – 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 14.4 кДа

же интактный антиген и продукты его деградации. На первом этапе иммуноблоттинга проводили электрофоретическое разделение препаратов ИФНβ в 15% SDS-ПААГ в невосстанавливающих условиях. Ранее было показано, что в восстанавливающих условиях ИФНβ теряет способность связываться с антителами (данные не приведены), поэтому иммуноблоттинг в восстанавливающих условиях не проводили. Методом иммуноблоттинга подтверждена специфичность анализируемых БсАт, показанная методом непрямого ИФА, – образцы антител взаимодействуют с препаратами гликозилированного ИФНβ («Фармапарк») и негликозилированного ИФНβ («Бетаферон») и окрашивают полосы, соответствующие молекулярным массам 18.5 кДа (негликозилированный ИФНβ) и 20–22 кДа (гликозилированный ИФНβ) (рис. 6).

Связывание БсАт с ErbB2. Полученные БсАт должны обладать реактивностью не только по отношению к ИФНβ, но и к поверхностной молекуле опухолевых клеток – ErbB2. Связывание БсАт

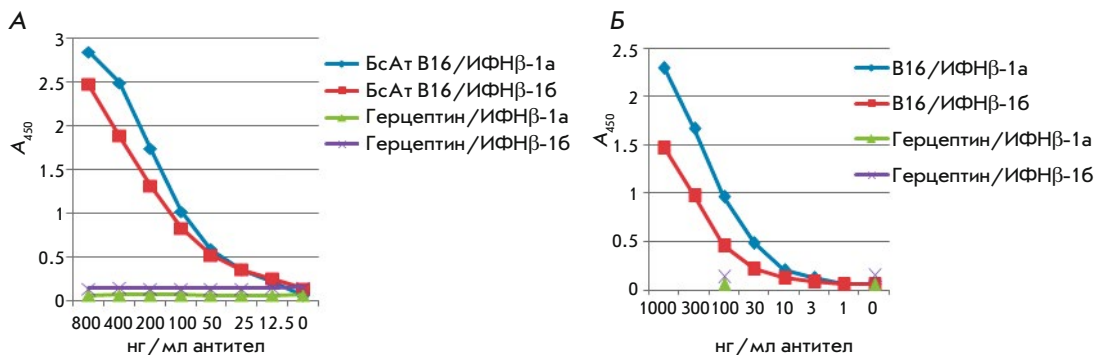


Рис. 5. Связывание биспецифических (А) и прототипных моноклональных мышинных антител (Б) с гликозилированным (ИФНβ-1а) и негликозилированным (ИФНβ-1б) ИФНβ. Герцептин – аптечный препарат, антитело к ErbB2 (отрицательный контроль)

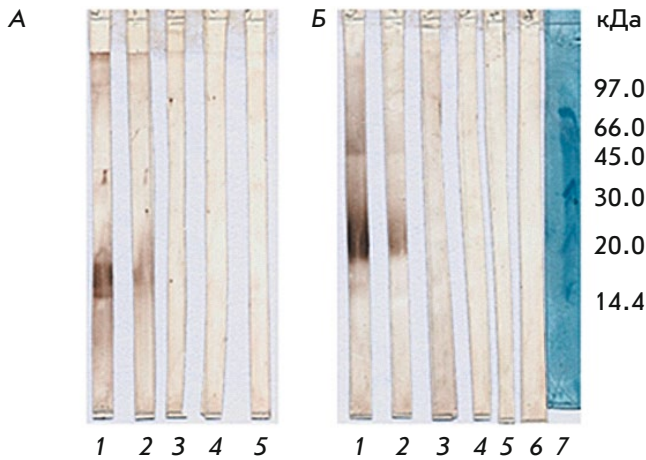


Рис. 6. Иммуноблот ИФНβ-16 (негликозилированного) «Бетаферон» (А) и ИФНβ-1а (гликозилированного) «Фармапарк» (Б) с БсАт в невосстанавливающих условиях после 15% SDS-ПААГ. Дорожки: 1 – БсАт V16/1, 2 – БсАт V16/2, 3 – Герцептин, 4 – отрицательный контроль (гуманизированные антитела против шигатоксина), 5 – контроль антивидового пероксидазного конъюгата антитела 4G7 к каппа-цепи Ig человека, 6 – трастузумаб, 7 – стандарты молекулярных масс

с ErbB2 исследовали методом непрямого ИФА с использованием клеточных лизатов. В качестве положительного контроля использовали аптечный препарат трастузумаб – Герцептин. ИФА проводили на лизатах линий опухолевых клеток как экспрессирующих, так и не экспрессирующих ErbB2 (рис. 7А,Б). Уровень экспрессии ErbB2 оценивали методом непрямого ИФА с использованием клеточных лизатов и препарата Герцептин (данные не приведены). Точка перегиба (EC_{50}) кривой титрования антитела Герцептин на ErbB2-экспрессирующей ли-

нии SKOV3 составила 15 нг/мл и более 3000 нг/мл на ErbB2-негативной линии SKOV3.

Биспецифические антитела взаимодействовали с клеточными лизатами ErbB2-позитивной линии SKOV3 (рис. 7А) и не взаимодействовали с лизатами клеток SKOV3 со слабой экспрессией HER2 (рис. 7Б). Также связывание БсАт с ErbB2 показано методом ИФА с сорбцией на твердую фазу рекомбинантного внеклеточного домена ErbB2, полученного в нашей лаборатории, по сравнению с аптечным препаратом Герцептин, специфичным к данному рецептору. Характер связывания БсАт в формате CrossMab с рецептором оказался таким же, как при связывании антитела Герцептин (рис. 7В).

Определение одновременного связывания интерферона-β и рецептора ErbB2 методом сэндвич-ИФА

Биспецифический характер связывания полученного антитела подтверждали с помощью сэндвич-ИФА в двух вариантах (рис. 8). В первом варианте на твердую фазу сорбировали ИФНβ (антиген 1), затем после блокировки инкубировали с БсАт в серийных разведениях. После отмывки несвязавшихся антител добавляли биотинилированный рекомбинантный ErbB2 (антиген 2) и конъюгат авидин-пероксидаза хрена. Во втором варианте на твердую фазу сорбировали рекомбинантный ErbB2 (антиген 1), затем БсАт также в серийных разведениях, биотинилированный ИФНβ (антиген 2) и конъюгат авидин-пероксидаза хрена. В качестве контроля использовали моноспецифические антитела: химерное нейтрализующее антитело V16 к ИФНβ и антитела к ErbB2 – аптечный препарат Герцептин и полученное нами рекомбинантное антитело трастузумаб (аналог Герцептина).

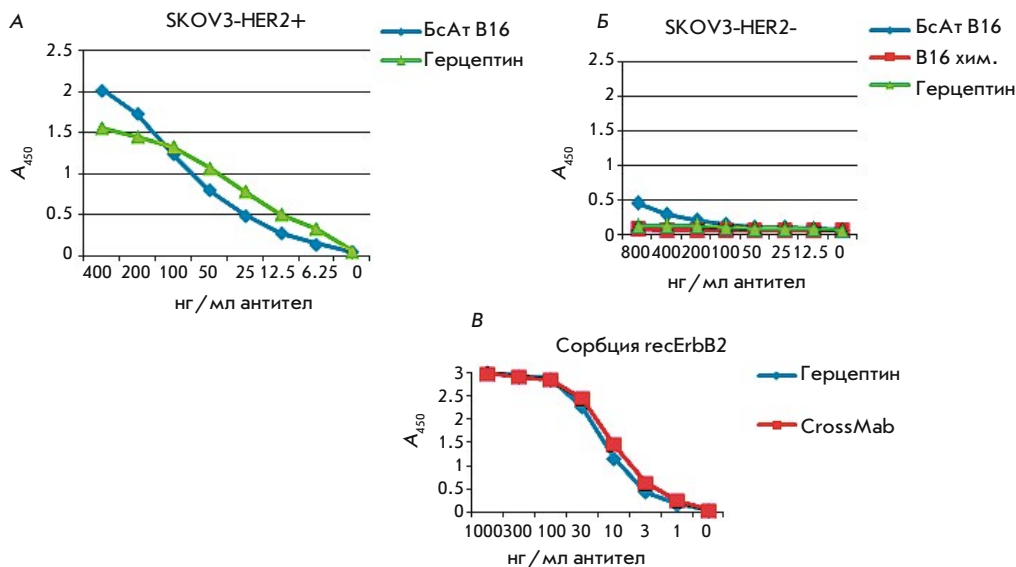


Рис. 7. Кривые титрования БсАт V16 и контрольного антитела Герцептин на лизатах HER2-сверхэкспрессирующей линии SKOV3 (А), HER2-слабоэкспрессирующей линии SKOV3 (Б), на рекомбинантном внеклеточном домене ErbB2-рецептора (В)

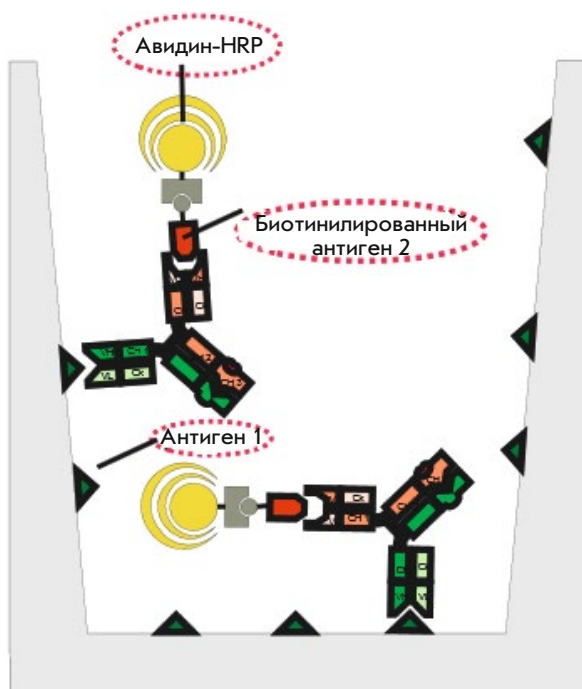


Рис. 8. Схема проведения сэндвич-ИФА для исследования одновременного связывания БсАт с ИФНβ и ErbB2-рецептором

В случае моноспецифичных антител сигнал ИФА не наблюдался. Биспецифичное антитело связывалось с ИФНβ и ErbB2 в обоих вариантах (рис. 9).

Биспецифичный характер полученных БсАт подтвержден результатами сэндвич-ИФА.

Интерферон-β-нейтрализующая активность биспецифических антител

Биологическую активность образцов БсАт оценивали в опытах по нейтрализации антипролиферативного действия ИФНβ. Биспецифические антитела, используемые в качестве средства доставки ИФНβ к опухолевым клеткам, должны обладать нейтрализующими свойствами по отношению к цитокину, чтобы избежать развития нежелательных системных реакций

во время транспортировки. Предполагается, что присоединение иммуноцитокринового комплекса к клеткам опухоли приведет к высвобождению ИФНβ и началу его антипролиферативного действия в дополнение к действию антитела к ErbB2. Способность антитела нейтрализовать ИФНβ оценивали с использованием клеточной модели, не содержащей ErbB2. Из-за влияния антипролиферативной активности части БсАт, ответственной за связывание с ErbB2, не представлялось возможным проанализировать антипролиферативную активность ИФНβ другим методом. Эксперименты проводили на линии аденокарциномы кишечника HT29, наиболее чувствительной, согласно предварительным экспериментам, к антипролиферативному действию ИФНβ (результаты не приведены). К серийным разведениям БсАт, а также контрольных антител: мышиного антитела V16, нейтрализующего ИФНβ, химерного и гуманизированного антител на основе V16 в качестве положительного контроля, добавляли рекомбинантный гликозилированный ИФНβ. Опухолевые клетки культивировали в смеси с МПК в присутствии ИФНβ и антител в различных концентрациях. Культивирование проводили в течение 5 сут. Количество живых клеток оценивали в тесте МТТ [27]. Нейтрализующую активность антител выражали в процентах от скорости пролиферации клеток без ИФНβ и вычисляли по формуле:

$$\% \text{нейтрализации} = (A_i - A_0) / (A_{100} - A_0) \times 100\%$$

где A_i – среднее значение оптической плотности в лунках с i -й концентрацией антитела, A_0 – среднее значение оптической плотности в лунках с ИФНβ без антител, A_{100} – среднее значение оптической плотности в лунках без ИФНβ и антител.

По результатам анализа (рис. 10) определен показатель нейтрализации IC_{50} для БсАт V16 – 50 мкг/мл, что в 2.5 раза выше, чем для прототипного антитела V16 мыши. Это может быть объяснено тем, что БсАт содержит только один интерферонсвязывающий сайт, тогда как мышиное антитело – два. Кроме того,

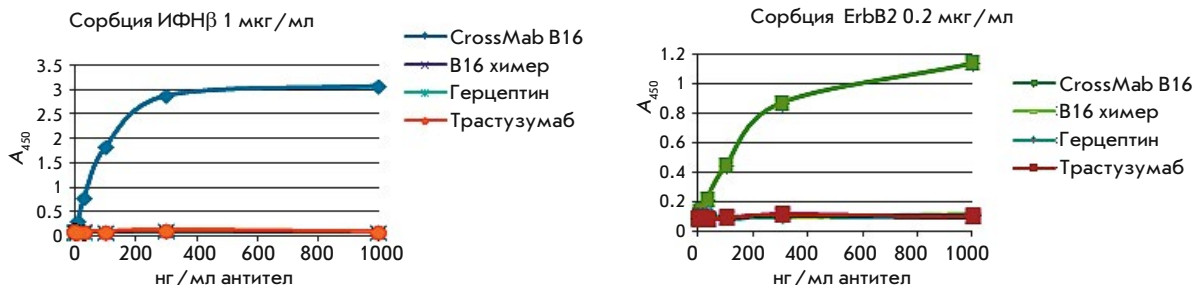


Рис. 9. Кривые титрования БсАт в сэндвич-ИФА по сравнению с прототипным химерным моноспецифичным антителом V16 против ИФНβ и моноспецифичными антителами против ErbB2-рецептора. CrossMabV16 – полноразмерное биспецифическое антитело против ErbB2-рецептора и ИФНβ

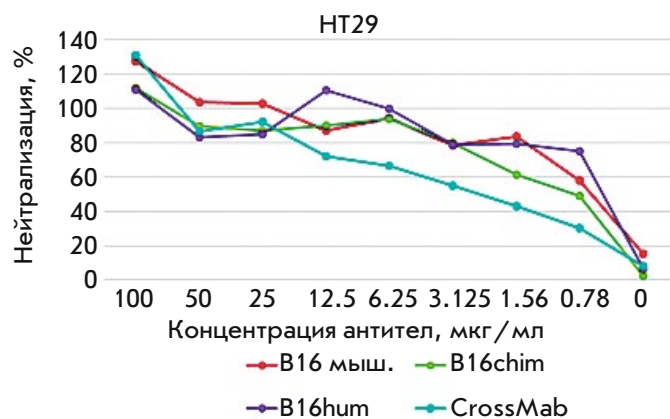


Рис. 10. Нейтрализация антипролиферативного действия интерферона-β биспецифическими антителами в формате CrossMab по сравнению с прототипными мышинными антителами B16, химерными (B16chim) и гуманизированными (B16hum) антителами

у БсАт B16 отсутствует эффект кооперативности связывания, так что его нейтрализующая активность соответствует теоретически предполагаемой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе нейтрализующего антитела B16 к ИФНβ и антитела трастузумаб (Тz), специфичного к ErbB2, нами получены биспецифические антитела в формате CrossMab с мутациями knob и hole в СН3-домене Н-цепей. Показано, что эти белки связывают и нейтрализуют ИФНβ, а также ErbB2 в лизатах опухолевых клеток и в виде рекомбинантного внеклеточного домена. Такие молекулы могут использоваться в качестве компонента иммуноцитокинного комплекса для доставки ИФНβ к клеткам ErbB2-ассоциированных опухолей, что позволит избежать побочных эффектов, вызванных введением ИФНβ в виде монопрепарата. Планируется проверить такой подход к терапии ErbB2-ассоциированных опухолей на моделях животных. ●

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение о субсидии № 075-15-2019-1385 от 19.06.2019, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0189).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. <https://nmicr.ru/meditsina/onkologicheskie-zabolevaniya-i-programmy-lecheniya-raka/programma-protiv-rakaverkhnikh-dykhatelnykh-putey-i-grudnoy-kletki/rak-molochnoy-zhelezy/>.
2. Ross J.S., Fletcher J.A., Linette G.P., Stec J., Clark E., Ayers M., Symmans W.F., Puztai L., Bloom K.J. // *Oncologist*. 2003. V. 8. P. 307–325.
3. Owens M.A., Horten B.C., Da Silva M.M. // *Clin. Breast Cancer*. 2004. V. 5. P. 63–69.
4. Moasser M.M. // *Oncogene*. 2007. V. 26. № 45. P. 6469–6487.
5. Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J., Stuart S.G., Udove J., Ullrich A., Press M.F. // *Science*. 1989. V. 244. P. 707–712.
6. Scholl S., Beuzebec P., Pouillart P. // *Ann. Oncol.* 2001. V. 12 (Suppl. 1). S81–S87.
7. Yan M., Schwaederle M., Arguello D., Millis Sh.Z., Gatalica Z., Kurzrock R. // *Cancer Metastasis Rev.* 2015. V. 34. P. 157–164; 10.1007/s10555-015-9552-6.
8. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е., Давыдов М.И. // *Молекулярная медицина*. 2010. № 4. С. 5–10.
9. Chantray A. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 3068–3073.
10. Diermeier S., Horvath G., Knechel-Clarke R., Hofstaedter F., Szollosi J., Brockhoff G. // *Exp. Cell Res.* 2005. V. 304. № 2. P. 604–619.
11. Vogel C.L., Cobleigh M.A., Gutheil J.C., Harris L.N., Fehrenbacher L., Slamon D.J., Murphy M., Novotny W.F., Burchmore M., Shak S., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2002. V. 20. P. 719–726.
12. Figueroa-Magalhães M.C., Jelovac D., Connolly R.M., Wolff A.C. // *Breast*. 2014. V. 23. № 2. P. 128–136.
13. Damdinsuren B., Nagano H., Sakon M., Kondo M., Yamamoto T., Umeshita K., Dono K., Nakamori S., Monden M. // *Ann. Surg. Oncol.* 2003. V. 10. P. 1184–1190.
14. Rosenblum M.G., Yung W.K., Kelleher P.J., Ruzicka F., Steck P.A., Borden E.C. // *J. Interferon Res.* 1990. V. 10. P. 141–151.
15. Vitale G., van Eijck C.H., van Koetsveld Ing P.M., Erdmann J.I., Speel E.J., van der Wansem Ing K., Mooij D.M., Colao A., Lombardi G., Croze E., et al. // *Ann. Surg.* 2007. V. 246. P. 259–268.
16. Horikoshi T., Fukuzawa K., Hanada N., Ezoe K., Eguchi H., Hamaoka S., et al. // *J. Dermatol.* 1995. V. 22. № 63. P. 1–6.
17. Wan S., Pestka S., Jubin R.G., Lyu Y.L., Tsai Y.C., Liu L.F. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 3. e32542.
18. Borden E.C. // *Nat. Rev. Drug Discovery*. 2019. V. 18. P. 219–234.
19. Dubrot J., Palazón A., Alfaro C., Azpilikueta A., Ochoa M.C., Rouzaut A., Martinez-Forero I., Teijeira A., Berraondo P., Le Bon A., et al. // *Int. J. Cancer*. 2011. V. 128. № 1. P. 105–118.
20. Trinh K.R., Vasuthasawat A., Steward K.K., Yamada R.E., Timmerman J.M., Morrison S.L. // *J. Immunother.* 2013. V. 36. P. 305–318.
21. Yang X., Zhang X., Fu M.L., Weichselbaum R.R., Gajewski T.F., Guo Y., Fu Y.X. // *Cancer Cell*. 2014. V. 25. P. 37–48.
22. Pogre S.L., Taura T., Bi M., Yun Y., Sho A., Mikesell G., Behrens C., Sokolovsky M., Hallak H., Rosenstock M.Y., et al. // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 9. e0162472.
23. Li Z., Zhu Y., Li C., Trinh R., Ren X., Sun F., Wang Y., Shang P., Wang T., Wang M., et al. // *Oncoimmunology*. 2017. V. 6. № 3. e1290038.
24. Алиев Т.К., Долгих Д.А., Кирпичников М.П., Панина А.А., Рыбченко В.С., Свешников П.Г., Солопова О.Н., Топорова В.А., Шемчукова О.Б. Моноклональное антитело, способное нейтрализовать биологическую активность интерферона бета-1а человека. Заявка на патент № 2018147193 от 28.12.2018.
25. (<https://www.drugbank.ca>)
26. Panda S.K., Ravindran B. // *Bio-protocol*. 2013. V. 3. № 3. P. 323.
27. Mosmann T. // *J. Immunol. Methods*. 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
28. Atwell S., Ridgway B.B., Wells J.A., Carter P. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 270. P. 26–35.
29. Tustian A.D., Endicott C., Adams B., Mattila J., Bak H. // *MABS*. 2016. V. 8. № 4. P. 828–838.
30. Schaefer W., Regula J.T., Böhner M., Schanzer J., Croasdale R., Dürr H., Gassner C., Georges G., Kettenberger H., Imhof-Jung S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 27. P. 11187–11192.
31. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.