

УДК 57.083; 57.088

Высокоаффинные однодоменные антитела для анализа апо- и голотрансферрина человека

С. В. Тиллиб*, О. С. Горяйнова, А. М. Сачко, Т. И. Иванова

Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: tillib@genebiology.ru

Поступило в редакцию 14.12.2021

Принято к печати 30.05.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11663

РЕФЕРАТ С использованием высокоэффективной технологии генерирования новых моноклональных однодоменных рекомбинантных антител (нанотел) получена панель нанотел, узнающих апо- и/или голотрансферрин человека. Проведен первичный анализ свойств двух вариантов новых нанотел, а также показаны уникальные потенциальные возможности их применения в диагностических исследованиях. Параллельное использование иммуносорбентов, создаваемых на основе этих нанотел, позволяет, по-видимому, выявлять изменения в относительной представленности апо- и голотрансферрина в биологических жидкостях человека. Такие изменения потенциально могут отражать повышенный риск или степень развития патологических процессов, например, злокачественных новообразований у человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА однодоменное антитело, нанотело, апо- и голотрансферрин, иммуносорбент, аффинная хроматография, диагностика.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Holo-Tf и apo-Tf – железосодержащий и железонесодержащий белок трансферрин; нанотело – рекомбинантный белок, соответствующий вариabельному домену особых верблужьих антител, состоящих из гомодимера укороченных тяжелых цепей, при отсутствии легких цепей иммуноглобулинов.

ВВЕДЕНИЕ

Железо – жизненно важный элемент, необходимый для осуществления ряда ключевых биологических процессов. Основными белками, регулирующими метаболизм железа в организме человека, являются трансферрин (Tf) и его рецепторы (TfR1 и TfR2) [1]. Высокая скорость пролиферации большинства опухолевых клеток, зависящая, в том числе, от поступления достаточного количества железа, часто ассоциирована с повышенной экспрессией TfR1 [2]. Tf – это гликопротеин размером 80 кДа, состоящий из двух субъединиц (N- и C- по 40 кДа). Каждая субъединица способна связывать один ион свободного трехвалентного железа (Fe^{3+}), т.е. к Tf можно присоединить до двух ионов железа. Насыщенную железом форму Tf обозначают как holo-Tf. Не содержащая железо форма Tf, называемая apo-Tf, с высокой эффективностью связывает Fe^{3+} в крови и транспортирует его на поверхность клетки для интернализации посредством взаимодействия с TfR [3]. Клеточный рецептор TfR1 связывает holo-Tf с высокой аффинностью ($K_d1 < 0.1$ нМ,

$K_d2 = 3.8$ нМ, pH 7.4), тогда как аффинность apo-Tf примерно в 100 раз меньше ($K_d1 = 49$ нМ, $K_d2 = 344$ нМ, pH 7.4) [4]. Комплекс железосвязанного Tf с рецептором, образующийся на поверхности клетки, интернализуется посредством клатрин-зависимого эндоцитоза. Работа протонного насоса в эндосомальной мембране приводит к снижению pH до 5.5 (закисление эндосомы), что запускает конформационные изменения как в Tf, так и в TfR1, что приводит к последующему высвобождению железа из Tf. Трехвалентное железо (Fe^{3+}) превращается в двухвалентное железо (Fe^{2+}), комплекс рецептор/apo-Tf затем возвращается на поверхность клетки, где apo-Tf высвобождается из связи с рецептором при нейтральных значениях pH [5].

Коэффициент насыщения трансферрина железом представляет собой широко используемый клинический параметр, который рассчитывается как отношение содержания железа в крови пациента к показателю общей железосвязывающей способности сыворотки крови [6]. Это довольно общая характеристика, которая не позволяет выявить тонкие из-

менения в относительной представленности разных форм трансферрина в крови при патологических процессах. Более адекватным инструментом для исследования таких вероятных тонких изменений могут быть специфические антитела. В данной работе мы описываем однодоменные антитела (нанотела) к разным формам трансферрина, полученные с помощью технологии, развиваемой и используемой в нашей лаборатории на протяжении многих лет [7–10].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плазма периферической крови трех больных с диагнозом рак яичников IV стадии по классификации FIGO и образец мочи одного больного с инвазивным раком мочевого пузыря любезно предоставлены Национальным медицинским исследовательским центром радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации. Плазму крови здоровых доноров получали по стандартному протоколу из проб крови, взятой у сотрудников с их согласия в медицинской лаборатории.

Полученные нами ранее библиотеки последовательностей, кодирующих нанотела [9], использовали при проведении новых процедур селекции с помощью модифицированного метода фагового дисплея как описано ранее [7–9]. В качестве антигенов-мишеней использовали коммерческие препараты holo-Transferrin human (holo-Tf) и apo-Transferrin human (apo-Tf) фирмы Sigma-Aldrich (США). Исходно отобранные последовательности однодоменных антител были переклонированы и оформатированы, после чего нанотела нарабатывали в периплазме бактерий, выделяли и очищали. Выделенные нанотела охарактеризованы с помощью электрофоретического и иммуноферментного анализа (ИФА) [7–9]. В ИФА для финальной детекции связавшегося конъюгата вторичных антител к НА-tagу с пероксидазой использовали реагент 1-Step Ultra TMB-ELISA (Thermo Scientific, США), добавляли 2 М серной кислоты и измеряли оптическую плотность (*OD*) при 450 нм. Получаемые в результате адаптационного переклонирования нанотела содержат на С-конце длинную линкерную последовательность (28 аминокислотных остатков длинного варианта шарнирного участка неканонического верблюжьего антитела), после которой идут два пептидных фрагмента: фрагмент из 9 аминокислот YPYDVPDYA (НА-tag) и последовательность из шести остатков гистидина (His-tag). Линкерный линейный участок содержит четыре удобно расположенных и хорошо доступных остатка лизина. По этим остаткам очень удобно проводить химические реакции пришивать другие молекулы, в том числе имму-

билизировать нанотело на BrCN-сефарозе. Нанотела пришивали к CNBr-активированной сефарозе 4В (GE Healthcare Life Sciences, США) согласно рекомендациям производителя и как описано ранее [8, 9]. Таким образом получали новые иммуносорбенты (иммуноаффинные колонки), специфичность которых определялась свойствами иммобилизованного нанотела. Иммуносорбенты с иммобилизованными нанотелами использовали для выделения связываемых белков как описано ранее [8, 9].

Константы связывания нанотел с каждой из форм трансферрина (holo-Tf и apo-Tf) в стандартном фосфатно-солевом буфере (PBS) pH 7.4 определяли на микрокалориметре MicroCal PEAQ-ITC (Malvern, Швейцария), используя прилагаемую к прибору программу (MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software) в Центре коллективного пользования ИБГ РАН. Модель подгонки – два сайта последовательного связывания – однозначно следовала из получаемых данных.

Для электрофоретического анализа белков отбирали аликвоты элюатов и анализировали в 5–19% градиентном SDS-полиакриламидном геле по Лэммли. Использовали прибор MiniProtean 3 (Bio-Rad, США), источник питания – Эльф-4 («ДНК-Технология», Россия). В качестве белкового маркера использовали Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

«Нативный» полиакриламидный гель-электрофорез, разработанный Новаковским и соавт. [11], удалось адаптировать для эффективного разделения holo-Tf и apo-Tf (в модификации, представленной на интернет-странице BraunLab – https://braunlab.de/?page_id=176). Использовали 10% разделяющий и 4% концентрирующий гели. Образцы для анализа готовили, добавляя к ним ×4 буфер для нанесения, содержащий 400 мМ Трис-НСl, 600 мМ Трис-base, 0.075% Coomassie G-250, 0.025% бромфенол, 40% глицерина. Только маркер прогревали перед нанесением (в стандартном SDS-буфере по Лэммли). Электрофорез проводили при 150 В и охлаждении (+4°C). По окончании электрофореза гель отмывали в дистиллированной воде (3 раза по 5 мин), затем окрашивали белки в Imperial™ Protein Stain (Thermo Fisher Scientific).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Используя коммерчески доступные препараты трансферрина, нам удалось методом фагового дисплея отобрать из созданной нами ранее библиотеки кДНК-последовательностей нанотел [9] два заметно различающихся мажорных варианта высокоаффинных нанотел, которые обладали относительно разным сродством к holo-Tf и apo-Tf и, по-видимому,

Таблица 1. Определение констант связывания нанотел аTf-1 и аTf-2 с двумя формами трансферрина (holo-Tf и apo-Tf) в растворе при pH 7.4 с помощью микрокалориметра MicroCal PEAQ-ITC (Malvern)

Название нанотела	Связывание с holo-Tf*	Связывание с apo-Tf*
aTf1	$K_d1 \approx 0.44$ нМ; $K_d2 \approx 1.44$ нМ	$K_d1 \approx 99.4$ нМ; K_d2 не определилась
aTf2	$K_d1 \approx 0.94$ нМ; $K_d2 \approx 0.75$ нМ	$K_d1 \approx 0.82$ нМ; $K_d2 \approx 14.5$ нМ

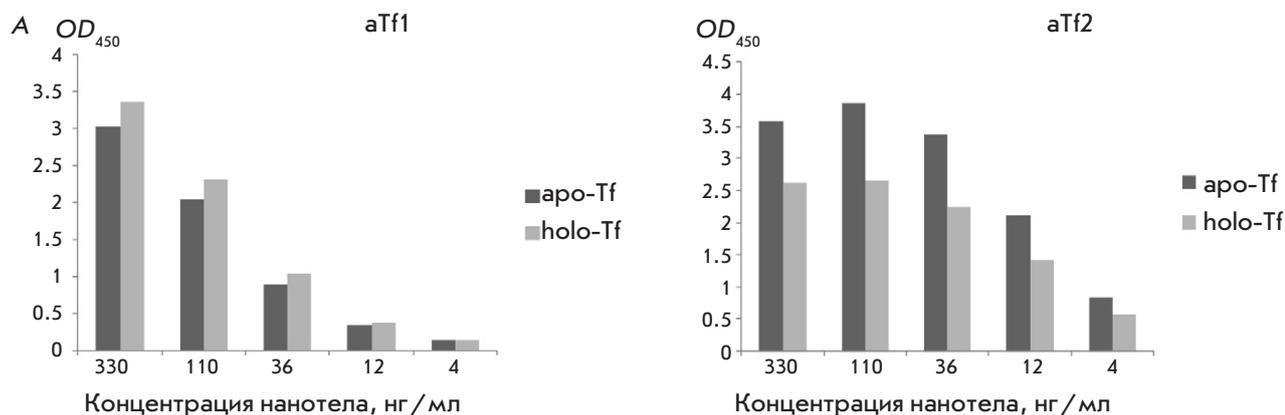
*Модель подгонки: сайты последовательного связывания, количество сайтов – 2.

узнавали разные эпитопы трансферрина (рис. 1, табл. 1).

Если в ИФА разница в связывании разных форм трансферрина полученными нанотелами была лишь слабо заметна (рис. 1А), то в растворе (табл. 1) и в составе иммуносорбента (рис. 2А) эти нанотела работали неожиданно селективно. Нанотело аTf1 в растворе (PBS) при pH 7.4 с очень высокой аффинностью связывает holo-Tf и при этом в 100 раз

слабее связывает apo-Tf. Интересно, что сходным образом с трансферрином взаимодействует рецептор TfR1 [4]. Другое нанотело, аTf2, в растворе связывает обе формы трансферрина, но, по-видимому, особенно хорошо – apo-Tf. Последовательности этих двух нанотел сильно отличаются (рис. 1Б). В случае аTf2 значительно увеличен CDR3 и имеется, по-видимому, дополнительная Cys-Cys-связь между CDR1 и CDR3. Оба варианта нанотел были адаптированы, наработаны в периплазме бактерий и очищены как описано ранее [7–9]. Адаптированные нанотела были иммобилизованы на CNBr-сефарозе [8, 9], в результате чего получили два новых иммуносорбента. Проверена специфичность связывания этих иммуносорбентов с коммерческими препаратами трансферринов (apo- и holo-).

Мы адаптировали и успешно использовали специальный вариант электрофореза в полиакриламидном геле без SDS для разделения железосвязанного и железонесвязанного трансферринов (рис. 2А). К нашему удивлению, в колоночном формате нанотело аTf2 практически не связывает holo-Tf и очень эффективно связывает apo-Tf. Нанотело аTf1, напротив, очень хорошо связывает holo-Tf и заметно



Б

aTf1 MAQVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAAS**GFTFSTYAMK**WVRQAPGMGLEYYVA**SINNGGTSTFYASVKG**
 RFTISRDNKNTLYLQLNSLKTEDTAMYYC**ARINEYSTR**GQGTQVTVSS

aTf2 MAQVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAVS**GYMYSTNCMG**WFRQAPGKEREGVA**AIYTGGSSTYYPDSVKG**
 RFTISQDNKNTVYQLQMNSLKPEDTAMYYC**AAMRHCPYGGNWDHPVNYL**GQGTQVTVSS

Рис. 1. Характеристика двух новых нанотел против трансферрина человека. А – иммунофлуоресцентный анализ связывания нанотелами аTf1 и аTf2 в разных разведениях иммобилизованного в лунке иммунологического планшета апотрансферрина (темный столбик) или голотрансферрина (светлый столбик). Значения оптической плотности OD_{450} (ось Y) соответствуют количеству связанных нанотел, приведены средние значения дубликатов с вариациями менее 5% (вычтено среднее фоновое значение ~0.06 контрольных лунок). Б – аминокислотные последовательности, выведенные из определенных секвенированием кДНК-последовательностей, двух нанотел к трансферрину человека. Подчеркнуты гипервариабельные участки CDR1, CDR2 и CDR3. В CDR1 и CDR3 нанотела аTf2 выявляются остатки цистеина (выделены серым цветом)

слабее, чем aTf2, связывает очищенный препарат apo-Tf. Далее иммуносорбенты в колоночном формате параллельно использовали для тестирования потенциально возможных различий в относительной представленности связываемых форм трансферрина в норме и патологии. На рис. 2 представлены первые результаты такого тестирования. Можно видеть, что если в случае образцов плазмы крови здоровых доноров (образцы 1, 2 и 3) элюаты с обеих колонок содержат примерно равное количество трансферрина, то в случае образцов, полученных от онкологических больных (на продвинутых стадиях рака яичника, образцы 4–6), хорошо видно, что больше белка связывается, а затем элюируется в случае нанотел aTf2. Весьма похожая ситуация наблюдается при анализе трансферрина в моче больного с инвазивной формой рака мочевого пузыря (образец 7). У здоровых доноров содержание трансферрина в моче в десятки раз ниже, и, согласно нашим предварительным наблюдениям, мы не видим заметных различий в количествах трансферрина, связываемого иммуносорбентами. Таким образом, этот тест позволяет детектировать изменения в относитель-

ных количествах и доступности для связывания определенных эпитопов разных форм трансферрина с помощью нанотел, что потенциально может иметь диагностический потенциал, в том числе и для мониторинга онкологических заболеваний, но надежность и воспроизводимость предлагаемого теста нужно оценить на большем числе образцов.

Пока мы можем лишь предположить, что могут означать наблюдаемые эффекты. Иммуносорбент с нанотелом aTf2 позволяет селективно выделять apo-Tf. В норме это примерно 2/3 всего трансферрина, содержащегося в крови. Иммуносорбент с нанотелом aTf1 преимущественно связывает holo-Tf и часть (примерно половину) apo-Tf. Как результат, оба иммуносорбента связывают примерно 2/3 всего трансферрина плазмы крови (разного по составу). Известно, что раковые клетки особенно эффективно потребляют железо, что может приводить к дефициту железа в окружающих опухоль биологических жидкостях и относительному увеличению доли apo-Tf. С другой стороны, holo-Tf, в отличие от apo-Tf, очень эффективно связывается с рецептором TfR1 на поверхности клетки. Однако TfR1

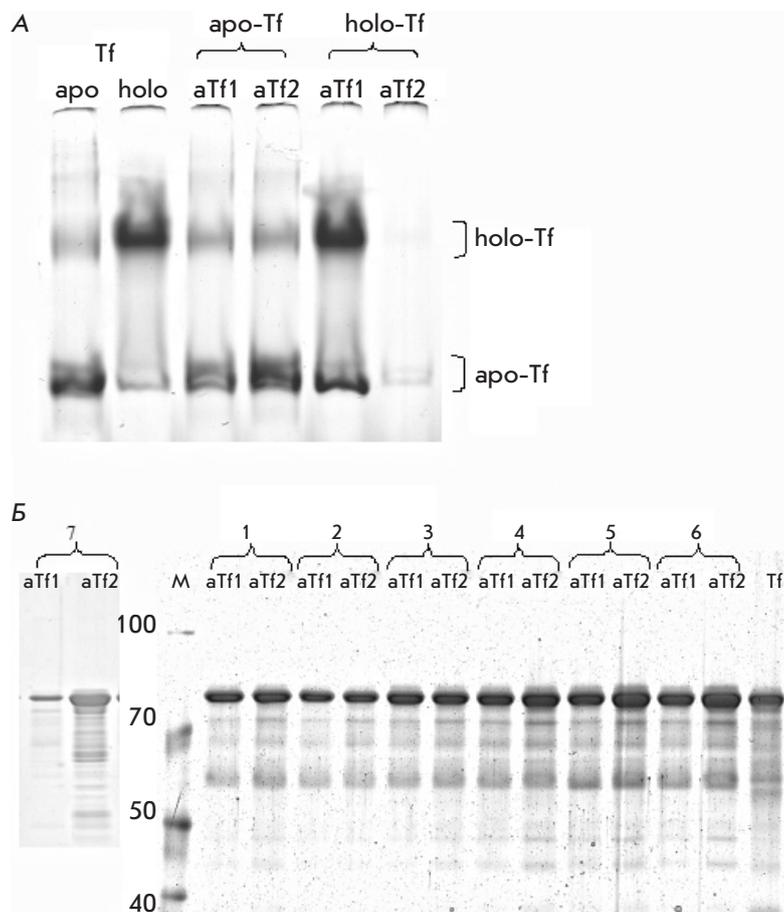


Рис. 2. Специфичность связывания разных форм трансферрина нанотелами, пришитыми к сефарозе. А – использование гель-электрофореза в условиях, сохраняющих целостность комплекса трансферрина с ионами железа, для демонстрации селективного связывания разных форм трансферрина (apo-Tf и holo-Tf) иммобилизованными нанотелами (aTf1 или aTf2). На двух дорожках слева нанесены исходные трансферрины. Б – электрофоретическое фракционирование в 5–19% градиентном SDS-полиакриламидном геле белков крови (или мочи), связавшихся с иммуносорбентами в физиологических условиях и затем элюированных. Выявление количественных различий в представленности, по-видимому, разных по насыщению железом форм трансферрина (все формы трансферрина локализируются при данном электрофоретическом фракционировании в одной мажорной полосе) во фракциях трансферрина, выделенных параллельно с помощью двух иммуносорбентов, содержащих иммобилизованные нанотела aTf1 или aTf2, у здоровых доноров (образцы крови 1, 2 и 3) и у онкологических больных (стадия IV рака яичника – 4, 5, 6, или в моче больного мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря – 7). Обозначены размеры маркерных полос. Tf – трансферрин (коммерческий препарат – маркер)

выявляется и в свободном, внеклеточном виде (как растворимый sTfR1 [12]). Нельзя исключить, что при патологических процессах подобные взаимодействия holo-Tf–TfR1 могут экранировать часть holo-Tf от связывания с нанотелом aTf1. В совокупности, мы наблюдаем эффект заметного увеличения формы трансферрина, которую связывает нанотело aTf2, но не связывает или плохо связывает нанотело aTf1. Интерес представляет гипотеза, согласно которой связанное с экзосомами увеличение apo-Tf в биологической жидкости может быть следствием интенсивного потребления железа опухолевыми клетками.

В заключение отметим, что в данной работе нами получены новые однодоменные антитела и иммуносорбенты на их основе, которые по-разному связывают различающиеся по насыщенности железом формы трансферрина. Такая способность дифференциального связывания полученных иммуносорбентов позволяет наблюдать относительные изменения в представленности разных форм трансферрина, прямо или косвенно ассоциированные с онкологическими заболеваниями. ●

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 19-015-00487) и РНФ (№ 20-14-00305).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Torti S.V., Torti F.M. // *Mol. Aspects Med.* 2020. V. 75. P. 100860.
2. Candelaria P.V., Leoh L.S., Penichet M.L., Daniels-Wells T.R. // *Front. Immunol.* 2021. V. 12. P. 607692.
3. André M.N., Silva A.M.N., Moniz T., de Castro B., Rangel M. // *Coordination Chem. Rev.* 2021. V. 449. P. 214186.
4. Kleven M.D., Jue S., Enns C.A. // *Biochemistry.* 2018. V. 57. P. 1552–1559.
5. Yiannikourides A., Latunde-Dada G.O. // *Medicines (Basel).* 2019. V. 6. P. 85.
6. Elsayed M.E., Sharif M.U., Stack A.G. // *Adv. Clin. Chem.* 2016. V. 75. P. 71–97.
7. Тиллиб С.В., Иванова Т.И., Васильев Л.А. // *Acta Naturae.* 2010. Т. 2. С. 100–108.
8. Tillib S.V., Privezentseva M.E., Ivanova T.I., Vasilev L.F., Efimov G.A., Gurskiy Ya.G., Georgiev G.P., Goldman I.L., Sadchikova E.R. // *J. Chromatogr. B.* 2014. № 949–950. P. 48–57.
9. Горяйнова О.С., Иванова Т.И., Рутовская М.В., Тиллиб С.В. // *Молекуляр. биология.* 2017. Т. 51. С. 985–996.
10. Тиллиб С.В. // *Молекуляр. биология.* 2020. Т. 54. № 3. С. 362–373.
11. Nowakowski A.B., Wobig W.J., Petering D.H. // *Metallomics.* 2014. V. 6. P. 1068–1078.
12. Speeckaert M., Speeckaert R., Delanghe J.R. // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2010. V. 47. № 5–6. P. 213–228.