



УДК 577.112.083

ПОЛУЧЕНИЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА В ФОРМАТЕ Fab-scFv НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛА К ИНТЕРФЕРОНУ БЕТА-1 ЧЕЛОВЕКА И АНТИТЕЛА К HER2-РЕЦЕПТОРУ

© 2020 г. А. А. Панина^{*,#}, В. А. Топорова^{*}, В. С. Рыбченко^{**},
Д. С. Балабашин^{*}, В. В. Аргентова^{**}, С. А. Якимов^{*}, О. Н. Солопова^{***, ****},
Т. К. Алиев^{**}, Д. А. Долгих^{*}, П. Г. Свешников^{***}, М. П. Кирпичников^{*, **}

^{*}ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

^{**}ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, ул. Ленинские Горы, 1

^{***}ОАО “Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения”,
Россия, 117638, Москва, Симферопольский б-р, 8

^{****}ФБГУ “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России, Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23

Поступила в редакцию 27.12.2019 г.

После доработки 11.01.2020 г.

Принята к публикации 20.01.2020 г.

Создание новых средств терапии злокачественных опухолей является актуальной задачей. В настоящее время гуманизированное антитело трастузумаб считается “золотым стандартом” в комплексной терапии опухолей молочной железы с гиперэкспрессией HER2, рецептора эпидермального фактора роста человека 2. Однако в ряде случаев наблюдается резистентность к указанному препарату. Поиск новых путей терапии HER2-позитивных опухолей представляется важным направлением исследований. В настоящее время проводится целый ряд клинических исследований по применению интерферона-бета человека (ИФН-бета) в онкологии. Большинство этих исследований используют вирусные векторы, несущие ген интерферона-бета, с целью уменьшения системного действия этого цитокина. Разрабатываемый нами иммуноцитоклиновый комплекс биспецифического антитела и ИФН-бета также содержит механизм ухода от системного действия ИФН-бета. Частью разработки такого комплекса является создание биспецифических антител различного формата. На основе нейтрализующего антитела В16 к ИФН-бета и антитела трастузумаб (Tz), специфичного к HER2-рецептору, нами получены различные варианты биспецифических антител в формате Fab-scFv. Показано, что полученные белки связывают и нейтрализуют ИФН-бета, также они связывают HER2-рецептор в лизатах опухолевых клеток и в виде рекомбинантного внеклеточного домена. Такие молекулы в составе иммуноцитоклинового комплекса с ИФН-бета могут быть использованы в качестве средств доставки ИФН-бета к клеткам HER2-позитивных опухолей.

Ключевые слова: интерферон-бета, СНО, Fab-scFv, трастузумаб, HER2

DOI: 10.31857/S0132342320040211

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные новообразования занимают второе место среди всех причин смерти после сер-

Сокращения: L – легкая цепь антитела; H – тяжелая цепь антитела; VH – варибельный домен H-цепи; VL – варибельный домен L-цепи; CH1 – 1-й константный домен IgG1 антитела; Fab-фрагмент – антиген-связывающий фрагмент антитела; scFv – одноцепочечные варианты антитела; HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2; ИФН-бета – интерферон-бета-1 человека; МТТ – бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий; Tz – трастузумаб; PCR, ПЦР – полимеразная цепная реакция; SOE-PCR – полимеразная цепная реакция с короткими перекрывающимися концами; МПК – мононуклеары периферической крови человека.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (916) 292-76-51; эл. почта: panian07@yandex.ru).

дечно-сосудистых заболеваний. На первом месте по распространенности у мужчин находятся опухоли органов дыхания, а у женщин – опухоли молочной железы, и значительную часть и тех, и других составляют опухоли с гиперэкспрессией рецептора эпидермального фактора роста HER2, что является показателем неблагоприятного прогноза исхода заболевания. Кроме того, HER2 может быть гиперэкспрессирован на опухолях мочевого пузыря, поджелудочной железы, яичника, матки, толстой кишки, почки, головы и шеи, желудка, пищевода и предстательной железы. Антитела к ассоциированным с опухолью поверхностным антигенам активно используются для иммунотерапии злокачественных опухолей человека, являясь более специфическими и обладая мень-

шим побочным эффектом, чем химиотерапевтические препараты [1]. Однако полноразмерные антитела, обладая молекулярной массой около 150 кДа, характеризуются слабой проникающей способностью в солидные опухоли в связи с замедлением диффузии через стенки сосудов. В то же время, молекулы менее 60 кДа, хорошо проникающая в опухоли, обладают небольшим временем нахождения в кровотоке, не обеспечивая достаточного накопления в опухоли. Поэтому получение модифицированных вариантов антител со средним размером молекул с хорошей проникающей способностью и достаточным временем жизни в кровотоке, является перспективным направлением [2]. Производные антител, лишенные эффекторного домена Fc, могут использоваться в качестве блокирующих агентов для рецепторов факторов роста и индукторов апоптоза [2]. Антитела и их производные также могут быть использованы как средства доставки к опухоли цитотоксических веществ (радиоизотопов, лекарственных препаратов, токсинов, цитокинов, других биологически активных белков) [2].

Рецептор эпидермального фактора роста человека 2 (HER2) сверхэкспрессируется в 20–30% случаев рака молочной железы и связан со снижением выживаемости пациентов [3]. С гиперэкспрессией HER2 связана распространенная аденокарцинома желудка или пищеводно-желудочного перехода и другие опухоли человека [4].

Гуманизированное моноклональное антитело трастузумаб Tz (торговая марка Герцептин), связывающееся с внеклеточным доменом HER2, было первым препаратом, одобренным для клинического применения при терапии HER2-гиперэкспрессирующих опухолей [3, 4]. Связываясь с HER2, Tz вызывает эндоцитоз и деградацию рецептора HER2 с последующим ингибированием сигнальных каскадов PI3K и MAPK, что, в конечном итоге, вызывает остановку клеточного цикла и апоптоз. Связывание Tz с HER2 может модулировать иммунную систему по механизму антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и ингибировать ангиогенез. Использование Tz как адъюванта в сочетании с химиотерапией или после нее повышает безрецидивную и общую выживаемость пациентов с ранней стадией рака молочной железы [3]. Однако серьезной клинической проблемой является наличие или возникновение резистентности к Tz, что требует дальнейших исследований возможностей комплексной терапии.

Интерферон бета-1 человека используется для лечения больных рецидивирующим рассеянным склерозом, оказывая противовоспалительное и иммуносупрессорное действие. Известно, что ИФН-бета обладает противовирусным, иммуномодулирующим и антипролиферативным действием [5]. Показана способность рекомбинантного

ИФН-бета оказывать сильное антипролиферативное действие *in vitro* на клетки двух человеческих андроген-резистентных клеточных линий рака предстательной железы с нейроэндокринной дифференцировкой (DU-145, PC-3) [6], аденокортикальной карциномы (ACC линии H295 и SW13) [7], гастроэнтеропанкреатических нейроэндокринных опухолей [8], клеточных линий аденокарциномы поджелудочной железы человека (VxPC-3, MiaPaCa-2 и Panc-1) [9]. Подробное рассмотрение механизма действия интерферонов I типа (ИФН-альфа и ИФН-бета), а также современный взгляд на их применение в терапии рака представлены в обзоре [10].

Как Tz, так и ИФН-бета разрешены к клиническому применению на территории Российской Федерации [5, 11].

Представленные результаты являются частью работы по созданию иммуноцитокинового комплекса рекомбинантного биспецифического антитела и рекомбинантного человеческого ИФН-бета для лечения HER2-гиперэкспрессирующих опухолей, в первую очередь, рака молочной железы. Одна из составных частей биспецифического антитела должна связывать ИФН-бета и нейтрализовать его системное воздействие, вторая должна быть способна связываться с рецептором HER2 на поверхности опухолевых клеток. Предполагается, что эффективность ИФН-бета в составе иммуноцитокинового комплекса будет достигнута путем локального накопления ИФН-бета в местах локализации опухоли и метастатических узлов. Доставка ИФН-бета к клеткам опухоли при помощи нейтрализующего антитела позволила бы избежать связывания ИФН-бета со своими рецепторами вне опухоли, обеспечила высокие локальные концентрации ИФН-бета вблизи опухоли и не позволила произвести запуск нежелательных системных реакций, обуславливающих клиническую картину побочных эффектов, характерных для ИФН-бета как монопрепарата.

Целью данной работы было получение биспецифического антитела в формате Fab-scFv, связывающегося одновременно с HER2 и ИФН-бета, как компонента иммуноцитокинового комплекса с ИФН-бета – потенциального агента для лечения опухолей с гиперэкспрессией HER2. Для создания такого антитела были выбраны антитело Tz и полученное нами ранее нейтрализующее антитело V16 к ИФН-бета [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изначально на основе кодирующих последовательностей нейтрализующего ИФН-бета антитела V16 и антитела Tz нами были сконструированы последовательности, кодирующие биспецифические антитела в формате Fab-scFv, представляю-

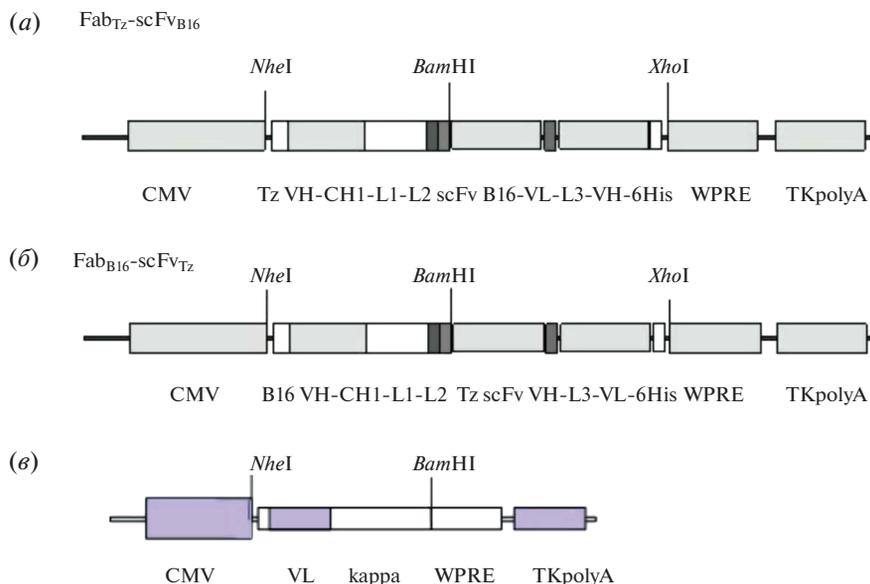


Рис. 1. Схема экспрессионных кассет в pcDNA3.4 для образования Fab_{Tz}-scFv_{B16} (а) и Fab_{B16}-scFv_{Tz} (б). Как в 1а, так и в 1б-вариантах кассет расположение генов переменных доменов в последовательности, кодирующей scFv, может быть VH-L3-VL или VL-L3-VH, где L3 – последовательность, кодирующая link3. Последовательности, кодирующие L-цепи Fab-фрагментов антител, клонированы по сайтам *NheI* и *XhoI* в отдельный вектор pcDNA3.4 Poly40 (в). CMV – промотор цитомегаловируса; Tz – последовательности, кодирующие тяжелую цепь Fab-фрагмента трастузумаба (а) или scFv, соответствующий трастузумабу (б); B16 – последовательность, кодирующая scFv B16 (а) или тяжелую цепь Fab-фрагмента антитела B16 (б). VH и VL – гены переменных доменов антител; CH1 – последовательность, кодирующая 1-й константный домен H-цепи антитела; L1, L2, L3 – последовательности, кодирующие линкеры link1, link2, link3 соответственно; WPRE – последовательность регуляторного элемента; TKpolyA – сигнальная последовательность полиаденилирования мРНК тимидинкиназы вируса простого герпеса; *NheI*, *BamHI*, *XhoI*, – сайты узнавания рестриктаз; 6xHis – последовательность, кодирующая гексагистидиновый пептид.

шие собой объединение Fab-фрагмента антитела Tz и одноцепочечного варианта (scFv) антитела B16, в котором scFv к ИФН-бета присоединены к С-концу VH-CH1-фрагмента H-цепи антитела Tz (Fab_{Tz}-scFv_{B16}) (рис. 1а). На 3'-конец последовательности, кодирующей scFv, была помещена последовательность, кодирующая гексагистидиновый пептид (6xHis), для выделения целевых белков с помощью аффинной хроматографии. Между VH-CH1-кодирующим фрагментом и scFv-кодирующим фрагментом для обеспечения подвижности соединения цепей антитела были помещены последовательности link1, кодирующая EPSGP, и последовательность link2, кодирующая (GGGS)₃. Для соединения последовательностей, кодирующих переменные домены в scFv, были использованы последовательности link3, кодирующие (GGGS)₄ либо (GGGS)₆. Последовательности линкеров были выбраны на основании литературных данных [13], которые, однако, не давали ответа на вопрос о предпочтительном порядке переменных доменов H- и L-цепей в scFv, поэтому нами были спланированы различные варианты расположения цепей: VL-link3-VH (рис. 1а) и VH-link3-VL (схема не представлена). Объединение фрагментов, кодирующих VH и VL, с одновременным введением сайтов узнавания рестриктаз для последу-

ющего клонирования, созданием link3 и присоединением последовательности, кодирующей 6xHis, производили методом SOE-PCR.

В качестве вектора для обеспечения биосинтеза целевого белка в клетках эукариот была выбрана плазмида pcDNA3.4 Poly40 (собственная модификация вектора pcDNA3.4, Invitrogen со встроенным полилинкером). Ген легкой цепи Tz и последовательность, кодирующая (VH-CH1)_{Tz}-link1-link2-scFv_{B16}-6xHis, с присоединенными к 5'-концу последовательностью Козак и последовательностями, кодирующими лидерные пептиды, были поставлены под контроль цитомегаловирусного промотора CMV. В экспрессионном векторе после генов находятся регуляторный элемент WPRE и сигнальная последовательность полиаденилирования мРНК тимидинкиназы вируса простого герпеса TKpA (рис. 1).

Для получения биспецифических рекомбинантных антител в формате Fab-scFv осуществляли трансфекцию клеток яичника китайского хомячка CHO парами экспрессионных векторов, один из которых обеспечивал синтез L-цепи антитела Tz, а другой – синтез VH-CH1-фрагмента H-цепи антитела Tz с присоединенным к нему scFv антитела к ИФН-бета.

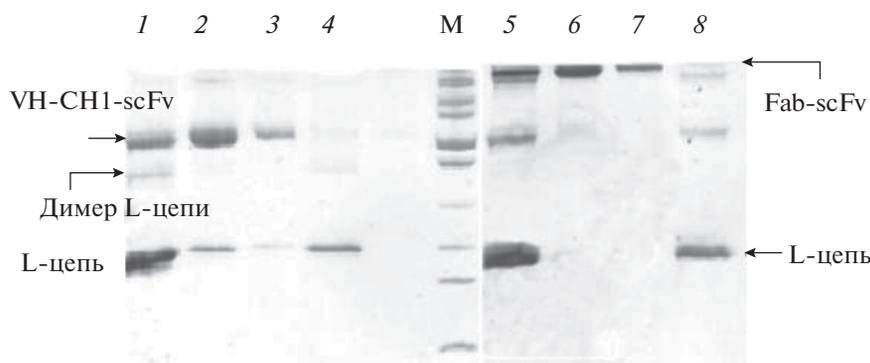


Рис. 2. Электрофореграмма образцов $\text{Fab}_{\text{Tz}}\text{-scFv}(\text{VH-4xG}_4\text{S-VL})_{\text{B16}}$ в 12% SDS-ПААГ. Дорожки 1, 5 – образцы после выделения на носителе kappa-select, 2, 3 и 6, 7 – фракции после выделения на носителе kappa-select и очистки металл-аффинной хроматографией, 4, 8 – просок после металл-аффинной хроматографии. Дорожки 1–4 – в присутствии β -меркаптоэтанола, 5–8 – в отсутствие β -меркаптоэтанола. М – маркеры молекулярных масс (116, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4, 14.4 кДа).

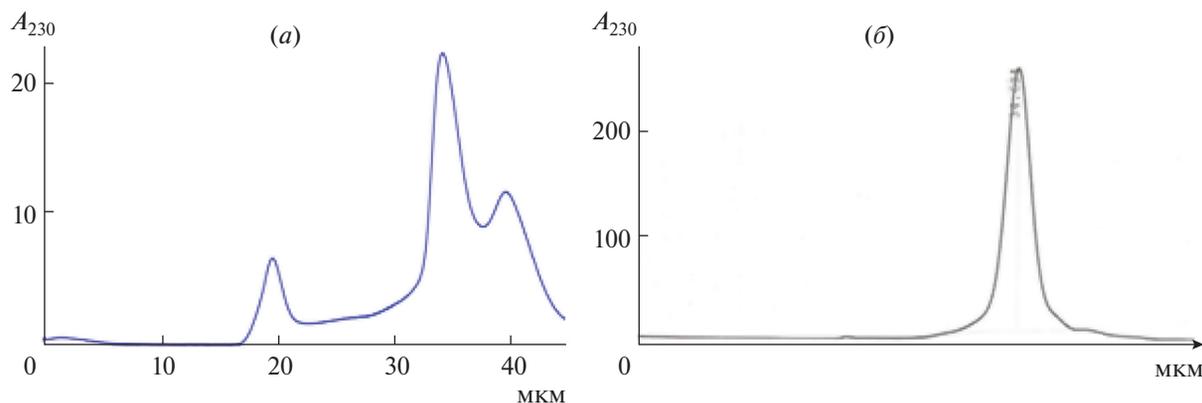


Рис. 3. ВЭЖХ-хроматограммы Fab-scFv после выделения на аффинном носителе HiTrap KappaSelect: $\text{Fab}_{\text{Tz}}\text{-scFv}_{\text{B16}}$ (а), $\text{Fab}_{\text{B16}}\text{-scFv}_{\text{Tz}}$ (б).

Выделение целевых белков проводили на колонке с носителем HiTrap KappaSelect, который обладает свойством преимущественного связывания L-цепи иммуноглобулинов. Оценку гомогенности и степени чистоты препарата проводили с использованием электрофоретического метода [14] и с помощью аналитической гель-фильтрации на носителе Superdex 200-10/300-GL. Было показано, что образцы Fab-scFv после выделения содержали примеси димера L-цепи антитела Tz (рис. 2, 3а). Наличие остатков гистидина в составе белка позволило применить дополнительную стадию очистки образцов с помощью металл-аффинной хроматографии с иммобилизованными на носителе ионами кобальта, что привело к удалению примеси димера L-цепи из препарата Fab-scFv (рис. 2).

Специфичность полученных $\text{Fab}_{\text{Tz}}\text{-scFv}_{\text{B16}}$ была проанализирована с помощью непрямого иммуноферментного анализа на лизатах клеток различных опухолевых линий, как с гиперэкспрессией,

так и с низкой экспрессией HER2. Клеточные лизаты – это смесь разнообразных белков, входящих в состав клетки. Среди них могут быть компоненты, склонные к неспецифическому связыванию с антителами, например, через углеводные части иммуноглобулинов. Неспецифическое связывание не всегда может быть убрано блокировкой, но его влияние на результаты анализа должно быть учтено. Для определения специфического связывания должны быть выбраны диапазоны концентраций антител, при которых неспецифическое связывание вносит несущественный вклад в результаты. С этой целью был поставлен иммуноферментный анализ на HER2-гиперэкспрессирующей и HER2-слабоэкспрессирующей клеточных линиях с использованием аптечного препарата Герцептин (положительный контроль). Эксперименты проводились как с блокировкой 1% BSA или 5% казеином, так и без блокировки. Было установлено, что при иммуноферментном анализе на

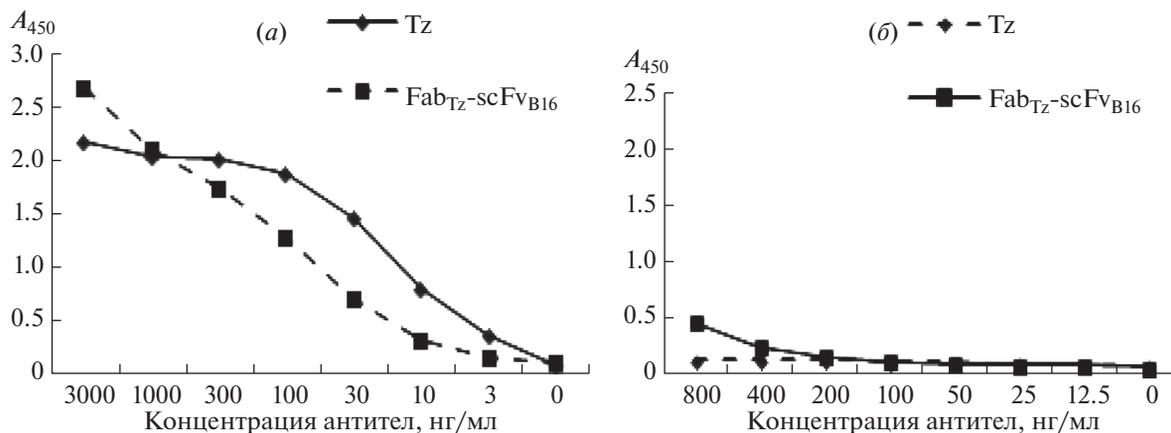


Рис. 4. Кривые титрования Fab_{Tz}-scFv_{B16} и контрольного антитела Герцептин (Tz) на лизатах HER2-гиперэкспрессирующей линии SKOV3 (а) и HER2-слабоэкспрессирующей линии SKOV3 (б).

клеточных лизатах подходящим диапазоном титрования антител является диапазон концентраций от 0 до 3 мкг/мл при обязательном контроле с использованием лизата HER2-негативной клеточной линии (данные не приведены). При проведении непрямого ИФА на лизатах клеток было показано, что Fab_{Tz}-scFv_{B16} достоверно связывают HER2 в составе клеточных лизатов HER2-гиперэкспрессирующей опухолевой линии (рис. 4а), при этом с лизатами HER2-слабоэкспрессирующей клеточной линии в диапазоне титрования антител до 1 мкг/мл связывания не происходит (рис. 4б).

При проведении непрямого ИФА с сорбцией ИФН-бета на твердую фазу с последующим нанесением Fab_{Tz}-scFv_{B16} было показано, что связывание с ИФН-бета таких молекул слабее по сравнению как с исходным мышинным моноклональным антителом, так и по сравнению с химерным полноразмерным антителом-прототипом B16 (данные не приведены).

Для того чтобы улучшить связывание Fab-scFv с ИФН-бета, было решено сконструировать Fab-scFv другого типа, в котором Fab-фрагмент образован VH-CH1-фрагментом и L-цепью антитела B16, а антитело Tz представлено в виде scFv-варианта (Fab_{B16}-scFv_{Tz}) (рис. 1б). Варианты расположения VH и VL в scFv антитела Tz, состав и длина линкеров, структура экспрессионных векторов для Fab_{B16}-scFv_{Tz} аналогичны конструкции Fab_{Tz}-scFv_{B16}.

Для получения новых биспецифических рекомбинантных Fab_{B16}-scFv_{Tz} так же, как и для Fab_{Tz}-scFv_{B16}, осуществляли трансфекцию клеток яичника китайского хомячка СНО парами плазмид, содержащими ген L-цепи антитела B16 и

последовательность, кодирующую (VH-CH1)_{B16}-link1-link2-scFv_{Tz}-6xHis.

Выделение целевых белков, оценку гомогенности и степени чистоты препарата проводили, как и в случае Fab_{Tz}-scFv_{B16}. После проведения аналитической ВЭЖХ было обнаружено, что при экспрессии Fab_{B16}-scFv_{Tz} не наблюдаются примеси димера L-цепи антитела B16 (рис. 3б), поэтому в дополнительной очистке методом металл-аффинной хроматографии не было необходимости.

Специфичность полученных Fab_{B16}-scFv_{Tz} также была проанализирована с помощью иммуноферментного анализа. Анализ проводился в двух вариантах: с сорбцией на твердой фазе рекомбинантного внеклеточного домена HER2 (рекHER2), полученного в нашей лаборатории (в печати) и с сорбцией ИФН-бета. Показано, что Fab_{B16}-scFv_{Tz} связывается как с рекHER2, так и с ИФН-бета (рис. 5).

При рассмотрении кривых титрования видно, что характер связывания Fab_{B16}-scFv_{Tz} с рекHER2 сходен с характером связывания полноразмерного биспецифического антитела (рис. 5а). Иммуноферментный анализ при титровании Fab-scFv на иммобилизованном препарате ИФН-бета показал способность Fab_{B16}-scFv_{Tz} связывать ИФН-бета, сравнимую с полноразмерными биспецифическими антителами (рис. 5б). Эти данные косвенно свидетельствуют о биспецифическом характере связывания Fab_{B16}-scFv_{Tz} с антигенами.

Для подтверждения биспецифичности Fab_{B16}-scFv_{Tz} был использован не прямой иммуноферментный анализ в «сэндвич»-модификации: а) с нанесением на подложку рекHER2, инкубированием с Fab-scFv, связыванием с биотинилированным ИФН-бета и детекцией после связывания с конъю-

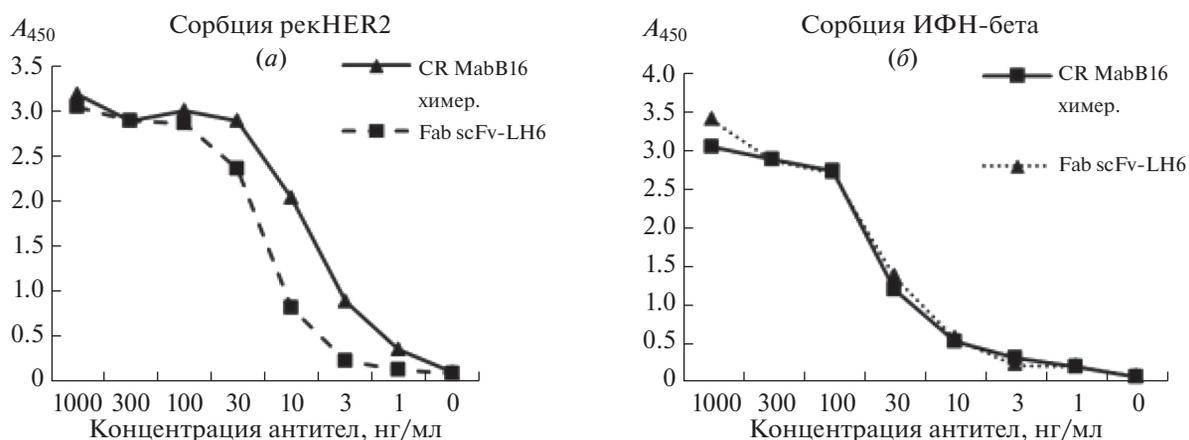


Рис. 5. Кривые титрования Fab_{B16}-scFv_{Tz} в непрямом ИФА по сравнению с полноразмерным биспецифическим антителом: взаимодействие с рекHER2 (а), взаимодействие с ИФН-бета (б). Fab scFv-LH6 – Fab_{B16}-scFv_{Tz}, в котором VL и VH в scFv разделены 6-ю повторами G₄S. CR MabB16химер. – полноразмерное биспецифическое антитело против HER2 и ИФН-бета.

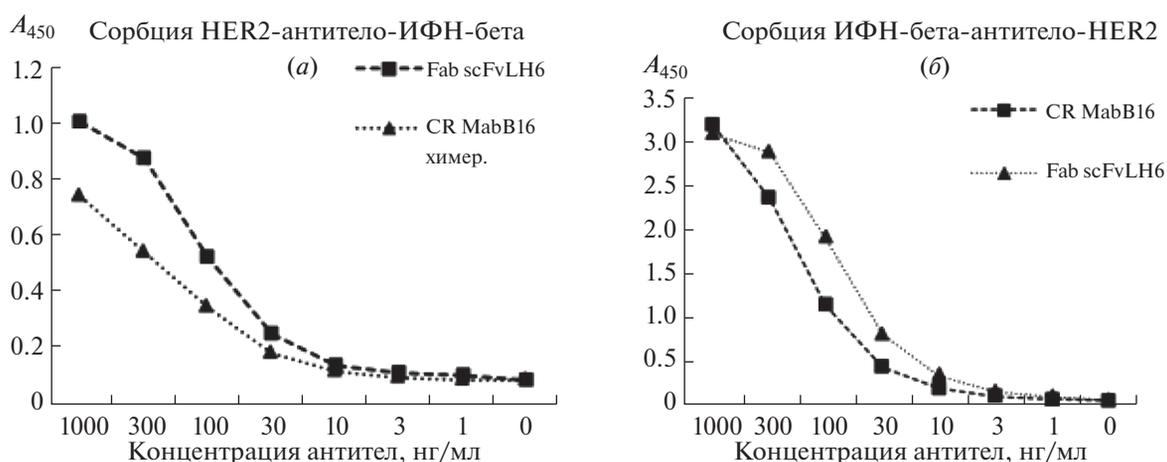


Рис. 6. Кривые титрования Fab_{B16}-scFv_{Tz} в “сэндвич”-ИФА по сравнению с полноразмерным биспецифическим антителом. (а) Первичная сорбция рекHER2, (б) первичная сорбция ИФН-бета. В Fab_{B16}-scFv_{Tz} VL и VH разделены 6-ю повторами G₄S. CR MabB16химер. – полноразмерное биспецифическое антитело против HER2 и ИФН-бета.

югатом стрептавидин-пероксидаза хрена (рис. 6а); б) с нанесением на твердую фазу ИФН-бета, последующим инкубированием с Fab-scFv, связыванием после отмытки с биотинилированным рекHER2 и детекцией после инкубирования с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена (рис. 6б).

Результаты “сэндвич”-ИФА подтвердили биспецифический характер полученных образцов Fab_{B16}-scFv_{Tz}.

Влияние различных вариантов расположения VH и VL и длин линкеров в scFv-части биспецифического антитела в формате Fab-scFv на связывание с HER2 и ИФН-бета также было исследовано в непрямом “сэндвич”-ИФА при сорбции рекHER2 на твердую фазу, инкубации с антитела-

ми, последующей инкубации с биотин-ИФН-бета и, наконец, с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена (рис. 7). В качестве отрицательного контроля использовалось моноспецифическое антитело к HER2-рецептору (Герцептин).

По результатам анализа непрямым “сэндвич”-ИФА можно сказать, что лучшими вариантами Fab_{B16}-scFv_{Tz} являются те, в которых в scFv находятся следующие расположения вариабельных доменов Tz, соединенных линкером G₄S с 4-мя или 6-ю повторами G₄S: VH-4x G₄S-VL и VL-6x G₄S-VH.

Биологическую активность полученных образцов Fab_{B16}-scFv_{Tz} оценивали в опытах по нейтрализации антителами антипролиферативного дей-

ствия ИФН-бета. Эксперименты проводились на клеточных линиях с разным уровнем экспрессии HER2: линии аденокарциномы кишечника HT29 (не экспрессирующей HER2), линии аденокарциномы яичника человека SKOV3-HER2+ (с высокой экспрессией HER2) и линии SKOV3 (с низкой экспрессией HER2). К серийным разведениям биспецифических Fab-scFv, а также контрольных антител: мышинового антитела B16, нейтрализующего ИФН-бета, в качестве положительного контроля и биспецифического антитела, проявляющего анти-HER2 активность, но не нейтрализующего ИФН-бета в качестве отрицательного контроля, добавляли рекомбинантный гликозилированный ИФН-бета. Опухолевые клетки культивировали в смеси с МПК в присутствии ИФН-бета и антител в различных концентрациях. Культивирование проводили в течение 5 суток. Количество живых клеток оценивали в тесте МТТ [15]. Нейтрализующую активность антител выражали в процентах от скорости пролиферации клеток без ИФН-бета 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 -той концентрацией антитела; A_0 – среднее значение оптической плотности в лунках с ИФН-бета без антител; A_{100} – среднее значение оптической плотности в лунках без ИФН-бета и антител. Поскольку биспецифические антитела обладают собственной антипролиферативной активностью по отношению к HER2-позитивным клеткам за счет анти-HER2 активности, из значений нейтрализующей активности для Fab-scFv в комплексе с ИФН-бета вычитали соответствующие значения для отрицательного контроля. Кривые титрования приведены на рис. 8.

Было показано, что Fab_{B16}-scFv_{Tz}, в структурах scFv которых расположение вариабельных доменов и состав линкера VH-4xG₄S-VL или VL-6xG₄S-VH, демонстрируют способность нейтрализовать антипролиферативную активность ИФН-бета, сравнимую или превосходящую активность исходного мышинового антитела B16, послужившего прототипом Fab-фрагмента (рис. 8).

Результаты проведенных экспериментов показывают, что полученные рекомбинантные антитела в формате Fab-scFv демонстрируют специфичность к двум различным антигенам: ИФН-бета человека и HER2-рецептору опухолевых линий. Показаны нейтрализующие свойства этих антител по отношению к ИФН-бета. Полученные характеристики антител позволяют использовать такие молекулы в качестве компонента иммунцитокинного комплекса с ИФН-бета для изуче-

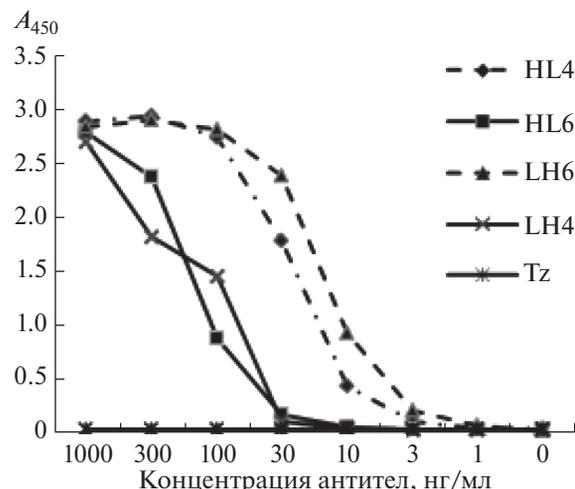


Рис. 7. Кривые титрования Fab_{B16}-scFv_{Tz} с различным расположением VH и VL и разными вариантами повторов G₄S (4 или 6) в scFv в непрямом “сэндвич”-ИФА при сорбции рекHER2 на твердую фазу. Линия Tz – титрование антитела Герцептин (отрицательный контроль).

ния терапевтической эффективности в отношении HER2-позитивных опухолей на животных моделях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы следующие реактивы и клеточные линии:

– питательные среды: DMEM (Gibco, США) и OptiCHO (Invitrogen, США), планшеты Nunc Maxisorp ELISA plates (Thermo Scientific, США),

– однокомпонентный субстрат 3,3',5,5'-Тетраметилбензидин (ТМВ) (НПО “БиоТест Системы”, Россия), Tween-20 (PanReas, Испания), эндонуклеазы рестрикции, Т4 ДНК-лигаза (Thermo Scientific, США и “СибЭнзим”, Россия), ДНК-полимераза Tersus (Evrogen, Россия), МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид), Pluronic F-68 (Invitrogen, США), Lipofectamine-3000 (Invitrogen, США),

– олигонуклеотидные синтетические праймеры (Евроген, Россия):

TzHF6 (5')CGGCGGTGGAGGGTTCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTC(3'),

IgG-Link1 (5')CTGCTCAAGATGGGGCGGC-GACGGCTTCTACGCCATGGACTACT(3'),

Link2F2 (5')CTCCTCGAGGGATCCCCCGGACCAGATGGTTCACAAGATTTGGGCTCAACTC(3'),

Link2R2 (5')CCGGGGGTGGCGGGTCTGGTGGTGGAGGCAGCGGTGGTGGGG(3'),

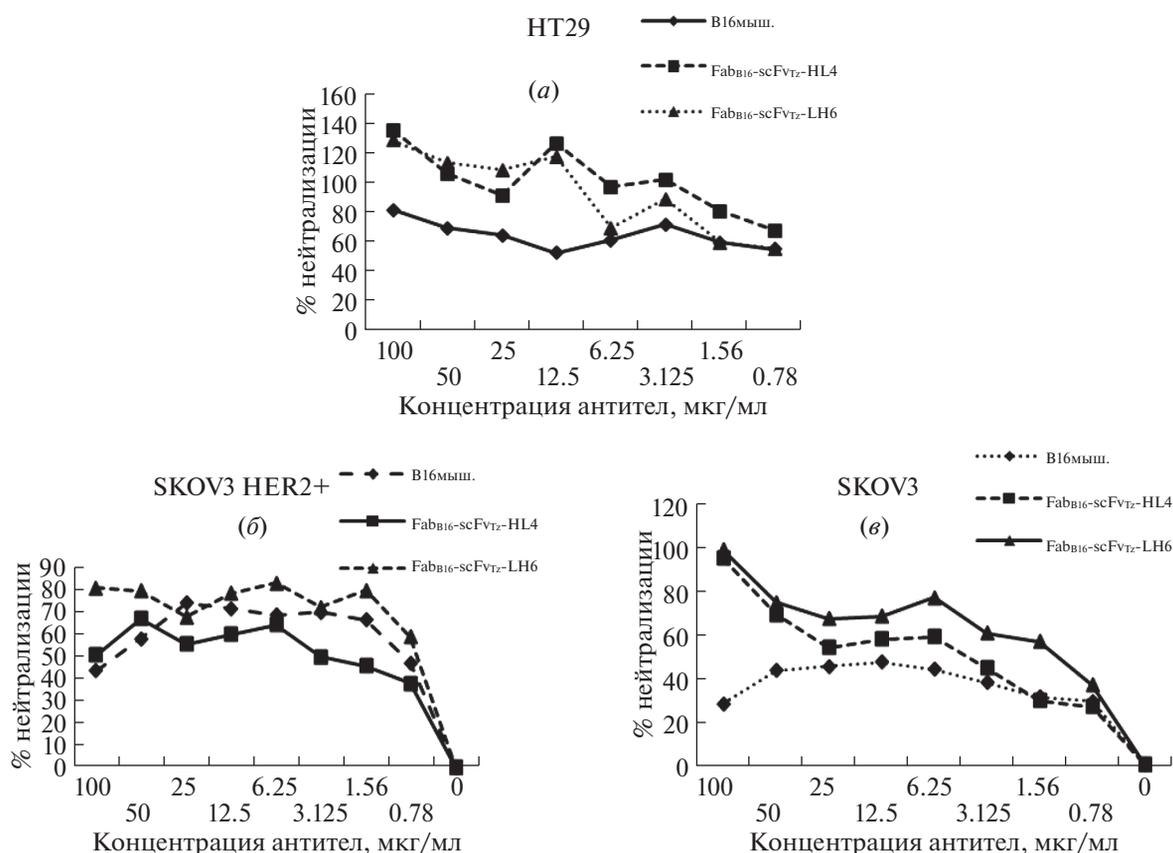


Рис. 8. Результаты нейтрализации антипролиферативной активности ИФН-бета биспецифическими $Fab_{B16-scFvTz}$. (a) HT29 – клетки линии аденокарциномы кишечника (не экспрессирующей HER2), (б) SKOV3 HER2+ – клетки линии аденокарциномы яичника человека (с гиперэкспрессией HER2), (в) SKOV3 – клетки с низкой экспрессией HER2. $Fab_{scFv-LH6}$ – $Fab_{B16-scFvTz}$, в котором VL и VH в scFv разделены 6-ю повторами G_4S . CR MabV16химер. – полноразмерное биспецифическое антитело против HER2 и ИФН-бета. $Fab_{scFv-HL4}$ – $Fab_{B16-scFvTz}$, в котором VH и VL в scFv разделены 4-мя повторами G_4S . CR MabV16химер. – полноразмерное биспецифическое антитело против HER2 и ИФН-бета.

Link2R3 (5')GATCCCCCACCACCGCTGCCTC-CACCACCAGACCCGCCACCC(3'),

Link2F3 (5')CACCGCCAGAGCCACCTCCG-CCTGAACSTCCGCSTCCAGACCSTCCGCC-ACC(3'),

– препарат интерферона-бета: фармацевтическая субстанция гликозилированного ИФН-бета производства ООО “Фармапарк”,

– клетки яичника китайского хомячка СНО (Invitrogen, США),

– опухолевые клеточные линии: аденокарцинома яичника человека SKOV3-HER2 (ATCC® HTB-77™), аденокарцинома толстой кишки человека HT29 (ATCC® HTB-38™); аденокарцинома яичника человека SKOV3, утратившая гиперэкспрессию HER2.

Конструирование VH-CH1-фрагмента антитела трастузумаб. Последовательность, кодирующую N-цепь антитела Tz, укорачивали, оставляя последовательность, кодирующую CH1-домен. Работу проводили в два этапа. На первом этапе на матрице гена TzH с помощью ПЦР с праймерами TzHF6 и IgG-link1, получали фрагмент, кодирующий CH1-домен IgG1 с присоединенной к C-концу последовательностью, кодирующую EPSGP (link1), одновременно внося на 3'-конец фрагмента сайты узнавания рестриктаз *XmaI*, *VamNI* и *XhoI* для последующих клонирований. Выделенный после электрофоретического разделения продуктов ПЦР в 1% агарозном геле фрагмент присоединяли к последовательности, кодирующей VH_{Tz} по сайту узнавания рестриктазы *Bsp120I*. Полученную плазмиду обозначили как pcDNA3.4-TzVH-CH1-link1. На втором этапе к фрагменту, кодирующему VH-

СН1-антитела Tz и EPSGP (link1), присоединяли последовательность link2, кодирующую (GGGGGS)₃. Для этого с помощью отжига фосфорилированных олигонуклеотидных праймеров Link2F2 и Link2R2 получали олигонуклеотидный дуплекс с “липкими” концами *Xma*I и *Bam*HI, который клонировали в плазмиду pcDNA3.4-TzVH-CH1-link1, преобразованную рестриктазами *Xma*I и *Bam*HI, получив плазмиду pcDNA3.4-TzVH-CH1-link1-link2.

Конструирование scFv. Конструкции одноцепочечных вариантов антител к ИФН-бета получали с помощью ПЦР в несколько стадий. Для конструирования были составлены олигонуклеотидные праймеры, как специфичные к генам переменных доменов Н- и L-цепей антител, так и универсальные для последовательностей константных доменов обоих антител.

На первой стадии получали фрагменты, содержащие кодирующие последовательности VH- и VL-доменов B16, с помощью ПЦР со специфическими прямыми праймерами и универсальными обратными праймерами для СН1-доменов IgG и каппа-константного домена. Продукты реакции разделяли в 1% агарозном геле. Фрагменты выделяли из геля и использовали для второй стадии ПЦР с универсальными перекрывающимися олигонуклеотидными праймерами Link2F3 и Link2R3, вносящими на 3'-конец фрагментов, кодирующих переменные домены, и 5'-конец фрагментов, кодирующих константные домены антител, участки, кодирующие link3. Продукты реакции разделяли в 1% агарозном геле, фрагменты нужной длины выделяли из геля и использовали для третьей стадии ПЦР (SOE-PCR) с концевыми праймерами, которые вносили сайты рестрикции *Bam*HI и *Xho*I, а также последовательности, кодирующие 6xHis, на 3'-концы фрагментов перед сайтом *Xho*I. Продукты реакции клонировали в вектор pAL-TA (Евроген) и секвенировали.

Для получения последовательности, кодирующей scFv антитела Tz, использовали ту же схему получения и клонирования фрагментов.

Конструирование VH-CH1-фрагмента B16. Последовательность, кодирующую Н-цепь антитела B16 к ИФН-бета, укорачивали, заменяя кодирующую последовательность константных доменов фрагментом, полученным после рестрикции плазмиды pcDNA3.4-Tz VH-CH1-link1-link2 по сайтам узнавания рестриктаз *Bsp*120I и *Xho*I и содержащим кодирующую последовательность первого константного домена IgG1 и линкеров link1 (EPSGP) и link2 (GGGGGS)₃.

Получение экспрессионных векторов для Fab-scFv. Фрагменты, кодирующие scFv B16, клони-

ровали по сайтам узнавания рестриктаз *Bam*HI и *Xho*I в вектор pcDNA3.4-Tz VH-CH1-link1-link2. Аналогично, фрагменты, кодирующие scFv Tz, клонировали по сайтам узнавания рестриктаз *Bam*HI и *Xho*I в вектор pcDNA3.4-B16 Tz VH-CH1-link1-link2. Фрагменты, кодирующие L-цепи антител, клонировали по сайтам *Nhe*I и *Xho*I в вектор pcDNA3.4-Poly40.

Транзientная экспрессия Fab-scFv в клетках СНО. Клетки яичника китайского хомячка СНО были использованы для секретируемой экспрессии рекомбинантных Fab-scFv. Для этого клетки культивировали в колбах Эрленмейера в CO₂-инкубаторе при 37°C, 95% влажности и 8% CO₂ в стандартной бессывороточной среде CD OptiСНО с добавлением 200 мМ L-глутамин до конечной концентрации 8 мМ и 0.18% (v/v) Pluronic F-68 до концентрации 4 × 10⁶ клеток/мл за 24 ч до трансфекции. Во флаконы Эрленмейера объемом 125 мл засеивали 30 мл клеточной суспензии (4 × 10⁶ клеток) при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере с частотой 130 об./мин и через 20–24 ч проводили трансфекцию с использованием трансфецирующего реагента Lipofectamine-3000 согласно стандартному протоколу производителя [16]. Плазмидную ДНК добавляли к клеткам в виде ДНК-липосомного преципитата. Культуральный флакон инкубировали при температуре 37°C, 95% влажности, в атмосфере 8% CO₂ и непрерывном перемешивании 130 об./мин. Измерение концентрации клеток и их жизнеспособности проводили с использованием 0.4% раствора трипанового синего в камере Горяева. После 7–9 дней инкубации культуры осветляли центрифугированием при 1200 об./мин в течение 10 мин. Супернатант дополнительно центрифугировали при 4000 об./мин в течение 15 мин.

Выделение и очистка Fab-scFv. Выделение целевых белков проводили на колонке с носителем HiTrap KappaSelect (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) объемом 5 мл. К культуральной жидкости добавляли 10% объема 10-кратного Tris-HCl буфера (200 мМ Tris-HCl, 1.5 М NaCl, pH 7.2) и наносили на предварительно уравновешенную колонку при скорости потока 2–3 мл/мин при давлении не более 0.5 МПа. Колонку промывали буфером Tris-HCl объемом, равным 5 объемам колонки. Элюцию осуществляли буфером 0.1 М глицин, pH 3.0. Элюированный раствор нейтрализовали, добавляя 0.1 объема буфера для нейтрализации (1 М Tris, pH 8.0). Полученный раствор белка диализовали против фосфатного буфера (0.01 М Na₂HPO₄, 0.137 М NaCl, 0.0027 М KCl, pH 7.2) и стерилизовали через мембранные фильтры 0.22 мкм. Оценку гомогенности и степени

чистоты препарата проводили с использованием электрофоретического метода [14]. Дополнительно образцы охарактеризовывали с помощью аналитической гель-фильтрации на носителе Superdex 200-10/300-GL объемом 1 мл. Концентрацию целевых белков определяли спектрофотометрически с использованием NanoPhotometer P300 (IMPLEN, Germany). Дополнительную очистку препаратов Fab-scFv при необходимости проводили на Chelating Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) с иммобилизованными ионами кобальта согласно рекомендациям производителя.

Непрямой ИФА. Непрямой ИФА использовали для определения способности полученных белков взаимодействовать с ИФН-бета или рекомбинантным внеклеточным доменом HER2. Антигены в буфере PBS (0.5 мкг/мл) сорбировали на планшет, блокировали 5% раствором BSA в PBS и промывали. Затем добавляли исследуемые белки, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, промывали раствором 0.05% Tween 20 в PBS. После промывки добавляли конъюгат моноклонального антитела 4G7 против каппа домена 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% Tween 20 в PBS и добавляли проявляющий субстрат тетраметилбензидин. После развития окраски реакцию останавливали добавлением 10% серной кислоты. Измеряли оптическое поглощение при 450 нм.

Непрямой ИФА с использованием клеточных лизатов. ИФА проводили на лизатах клеток различных опухолевых линий, как экспрессирующих, так и не экспрессирующих HER2. Для приготовления лизатов культуральные флаконы или чашки Петри помещали на лед, промывали один 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. Затем клеточный осадок лизировали буфером RIPA с добавлением ингибиторов протеаз 1 mM PMSF и 1 mM аprotинина. Состав буфера RIPA: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% дезоксиколат натрия, 2.5 mM пиррофосфат натрия, 1 mM б-глицерофосфат, 1 mM Na₃VO₄, 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. Кле-

точные лизаты сорбировали на планшет в концентрации 10 мкг/мл в PBS (0.01 M KН₂PO₄, 0.1 M 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 биспецифических антител титровали от 3000 нг/мл с шагом 3 в PBS-AT (0.01 M KН₂PO₄, 0.1 M 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-бета и рецептора HER2 методом “сэндвич”-ИФА. Подтверждение биспецифического характера связывания полученного антитела проводили с помощью “сэндвич”-ИФА в двух вариантах. В 1-ом варианте на твердую фазу сорбировали ИФН-бета (1 мкг/мл) в количестве 100 мкл/лунку, затем после блокировки инкубировали с Fab-scFv (1 мкг/мл) в серийных разведениях, кратным 3. После отмывки несвязавшихся антител добавляли биотинилированный рекомбинантный HER2 (200 нг/мл) и конъюгат авидин-пероксидаза хрена (150 нг/мл). Во 2-ом варианте на твердую фазу сорбировали рекомбинантный внеклеточный домен HER2 (200 нг/мл), затем Fab-scFv также в серийных разведениях, биотинилированный ИФН-бета (250 нг/мл) и конъюгат авидин-пероксидаза хрена (150 нг/мл). В качестве контроля использовали моноспецифичное антитело против HER2-рецептора (Герцептин) и полученное нами рекомбинантное, биспецифичное к HER2-рецептору и ИФН-бета, полноразмерное антитело.

Определение нейтрализующей активности Fab-scFv. Для анализа использовали опухолевые клетки человека 3-х линий: аденокарцинома кишки HT29, не экспрессирующая HER2; аденокарцинома яичника человека SKOV3 с низкой экспрессией HER2; аденокарцинома яичника человека SKOV3-HER2+ с высокой экспрессией HER2. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МПК) выделяли из цельной крови здорового донора в градиенте фикола-1077 по методике [17].

Готовили серийные разведения антител биспецифических Fab-scFv, а также контрольных антител: мышинового антитела В16, нейтрализующего ИФН-бета, в качестве положительного контроля и биспецифического антитела, обладающего анти-HER2 активностью, но не нейтрализующего ИФН-бета, в качестве отрицательного контроля (-Кон-

троль). К антителам добавляли рекомбинантный гликозилированный ИФН-бета производства ООО “Фармапарк” в концентрации 3 нг/мл. Все растворы готовили в полной ростовой среде с 2% телячьей сывороткой.

Опухолевые клетки культивировали в смеси с МПК в присутствии ИФН-бета и антител в различных концентрациях. Конечные концентрации активных веществ и клеток составили следующие значения: антитела – от 0 до 100 мкг/мл; ИФНб – 1 нг/мл (0 в контрольных лунках); МПК – 50 тыс. клеток/лунку; опухоли: 3 тыс. клеток/лунку. Культивирование проводили в течение 5 суток. Количество живых клеток оценивали в тесте МТТ [15]. Каждое измерение проводили в 4 повторах, находили среднее значение. Нейтрализующую активность антител выражали в процентах от скорости пролиферации клеток без ИФН-бета 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 -той концентрацией антитела; A_0 – среднее значение оптической плотности в лунках с ИФН-бета без антител; A_{100} – среднее значение оптической плотности в лунках без ИФН-бета и антител. Поскольку биспецифические антитела обладают собственной антипролиферативной активностью по отношению к HER2-позитивным клеткам за счет анти-HER2 активности (Tz), из значений нейтрализующей активности для Fab-scFv в комплексе с ИФН-бета вычитали соответствующие значения для контрольного антитела (–Контроль).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе нейтрализующего антитела В16 к ИФН-бета и антитела трастузумаб (Tz), специфичного к HER2-рецептору, нами получены различные варианты биспецифических антител в формате Fab-scFv. Показано, что полученные белки связывают и нейтрализуют ИФН-бета, также они связывают HER2-рецептор в лизатах опухолевых клеток и в виде рекомбинантного внеклеточного домена. Такие молекулы могут быть использованы в качестве компонента иммуноцитокинного комплекса с ИФН-бета для доставки ИФН-бета к клеткам HER2-позитивных опухолей, что позволило бы избежать проявления побочных эффектов при введении ИФН-бета в виде монопрепарата. Планируется проверить такой подход к терапии HER2-позитивных опухолей на моделях животных.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение о суб-

сидии № 075-15-2019-1385 от 19.06.2019, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0189).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sharkey R.M., Goldenberg D.M. // CA Cancer J. Clin. 2006. V. 56. P. 226–243.
2. Schoonoghe S., Kaigorodov V., Zawisza M., Dumolyn C., Haustraete J., Grooten J., Mertens N. // BMC Biotechnol. 2009. V. 9. P. 70.
3. Nahta R., Esteva F. // Oncogene. 2007. V. 26. P. 3637–3643.
4. <https://www.roche.ru/ru/produkty/katalog/gerceptin.html>.
5. Регистр лекарственных средств России. https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2711.htm.
6. Dicitore A., Grassi E.S., Borghi M.O., Gelmini G., Cantone M.C., Gaudenzi G., Persani L., Caraglia M., Vitale G. // J. Endocrinol. Invest. 2017. V. 40. P. 761–770.
7. van Koetsveld P.M., Vitale G., de Herder W.W., Feelders R.A., van der Wansem K., Waaijers M., van Eijck C.H., Speel E.J., Croze E., van der Lely A.J., Lamberts S.W., Hofland L.J. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2006. V. 91. P. 4537–4543.
8. Vitale G., de Herder W.W., van Koetsveld P.M., Waaijers M., Schoordijk W., Croze E., Colao A., Lamberts S.W., Hofland L.J. // Cancer Res. 2006. V. 66. P. 554–562.
9. 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., Lamberts S.W., Hofland L.J. // Ann. Surg. 2007. V. 246. P. 259–268.
10. Borden E.C. // Nat. Rev. Drug Discov. 2019. V. 18. P. 219–234.
11. Регистр лекарственных средств России. https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_87759.htm.
12. 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. Заявка на патент № 2018147193 от 28.12.2018.
13. Brinkmann U., Kontermann R.E. // MAbs. 2017. V. 9. P. 182–212.
14. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
15. Mosmann T. // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. P. 55–63.
16. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/lipofectamine3000_protocol.pdf.
17. Panda S.K., Ravindran B. // Bio-protocol. 2013. V. 3(3). P. 323.

The Development of the Bispecific Antibody in Fab-scFv-Format Based on an Antibody to Human Interferon Beta-1 and Antibody to HER2 Receptor

A. A. Panina*.,#, V. A. Toporova*, V. S. Rybchenko**,
D. S. Balabashin*, V. V. Argentova**, S. A. Yakimov*, O. N. Solopova***,****,
T. K. Aliev**, D. A. Dolgikh*, P. G. Sveshnikov***, and M. P. Kirpichnikov*.,**

#Phone: +7 (916) 292-76-51; e-mail: paniann07@yandex.ru

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, str. 12, Moscow, 119991 Russia

***Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy, Simferopolsky bulv. 8, Moscow, 117638 Russia

****Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology"
of the Ministry of Health of the Russian Federation (N.N. Blokhin NMRCO), Kashirskoe shosse 23, Moscow, 115478 Russia

The development of new therapies for malignant tumors is an urgent task. Currently, the humanized antibody trastuzumab is considered the "gold standard" in the complex treatment of breast tumors with overexpression of HER2, human epidermal growth factor receptor 2. However, in some cases, resistance to the specified drug is observed. The search for new therapies for HER2-associated tumors seems to be an important area of research. A number of clinical studies are currently underway on the use of human interferon-beta (IFN-beta) in oncology. Most of these studies use viral vectors carrying the interferon-beta gene to reduce the systemic effect of this cytokine. The immunocytokine complex of the bispecific antibody and IFN-beta developed by us also contains a mechanism for avoiding the systemic action of IFN-beta. Part of the development of such a complex is the creation of bispecific antibodies of various formats. Based on the neutralizing B16 antibody to IFN-beta and the trastuzumab (Tz) antibody specific for the HER2 receptor, we obtained various variants of bispecific antibodies in Fab-scFv format. It was shown that the obtained proteins bind and neutralize IFN-beta, and they also bind the HER2 receptor in tumor cell lysates and as a recombinant extracellular domain. Such molecules in the immunocytokine complex can be used as delivery vehicles of IFN-beta to HER2-positive tumor cells.

Keywords: IFN-beta, CHO, Trastuzumab, Fab-scFv, HER2