

УДК 576.535

РЕКОМБИНАНТНЫЕ КЛЕТКИ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕЧЕННЫХ РАДИОНУКЛИДАМИ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ЭНДОГЛИНА (CD105)

© 2022 г. О. А. Шашкова^{1, *}, И. В. Смирнов¹, А. А. Пиневиц^{1, 2}, К. О. Авров¹,
Л. А. Терехина¹, И. С. Малахов¹, А. Ю. Столбовая¹, И. В. Грязева¹, Н. Л. Варганян¹,
И. Ю. Крутецкая¹, Д. О. Антуганов¹, С. В. Шатик¹, М. П. Самойлович^{1, 2}

¹Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. академика А.М. Гранова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, 197758 Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: ujinolga@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.12.2021 г.

После доработки 21.12.2021 г.

Принята к публикации 27.12.2021 г.

Одна из важнейших характеристик меченных радионуклидами антител и их производных — размер иммунореактивной фракции. Для измерения этого параметра требуется высокая плотность молекул-мишеней, что редко достигается при использовании опухолевых клеток. Решением проблемы тестирования радиоиммуноконъюгатов стало создание рекомбинантных клеток, несущих эндоглин (CD105) человека. Реципиентами гена эндоглина (*ENG*) служили клетки С6 глиомы крыс, которые отличаются простотой культивирования и высокой эффективностью трансфекции. Полученные клетки линии С6-*ENG* несли на мембране 1.3×10^6 молекул CD105 и были использованы для определения иммунореактивной фракции меченных радионуклидами ⁶⁸Ga и ⁸⁹Zr анти-CD105-моноклональных антител и их Fab-фрагментов. Создание стабильных рекомбинантных клеточных линий, предназначенных для *in vitro* тестирования специфической активности меченных радионуклидами антител и их производных, представляется перспективным при разработке новых радиофармпрепаратов.

Ключевые слова: моноклональные антитела, Fab-фрагменты, радиоизотопы, радиоиммуноконъюгаты, иммунореактивная фракция, рекомбинантные клетки, трансфекция, молекулярные мишени, эндоглин, CD105

DOI: 10.56304/S0234275822010069

В последние десятилетия расширяются технические возможности создания и использования в клинической практике меченных радионуклидами лигандов, способных специфически связываться с рецепторами на мембранах опухолевых клеток или клеток иммунной системы, отвечающих за формирование противоопухолевого иммунитета. К такого рода лигандам относят антитела, Fab или F(ab)₂-фрагменты антител, наноантитела, карманные белки, пептиды и другие [1]. В зависимости от планируемого применения радиофармпрепаратов при их создании используют различные радиоизотопы, которые требуют индивидуальных технологий конъюгации с белковыми молекулами [2–4].

Одним из важнейших показателей, определяющих эффективность использования меченных радионуклидами препаратов антител, является доля молекул антител, сохранивших после конъюгации с радионуклидами способность к специфическому связыванию с молекулами-мишенями, которая обозначается как “иммунореактивная фракция” (ИРФ).

В ситуациях, когда мишени представляют собой мембранные рецепторы, для определения ИРФ используют *in vitro* методы, основанные на оценке связывания радиоиммуноконъюгатов с клетками, несущими молекулы-мишени. Для определения значения ИРФ, как правило, используют стабильные культуры линий опухолевых клеток. Однако далеко не все молекулы-мишени представлены на мембранах этих клеток в высокой плотности. Между тем, для получения значения ИРФ необходим избыток антигена, чего в условиях экспери-

Список сокращений: ИРФ — иммунореактивная фракция; моноАТ — моноклональные антитела; DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндолин; DFO — дефероксамин; *ENG* — ген эндоглина человека.

мента можно достичь только при высокой плотности мембранных молекул-мишеней.

Решением проблемы может быть создание с помощью методов генной инженерии клеточных линий, несущих на клеточной мембране молекулы-мишени в высокой плотности. При создании таких клеток донорами нуклеотидных последовательностей, кодирующих молекулы-мишени, могут быть клетки перевиваемых линий, первичных культур или иные клетки, в которых экспрессируется ген интереса. В качестве реципиентов генетического материала предпочтительно использовать клеточные линии, которые не требуют специальных условий культивирования и легко поддаются трансфекции. Рекомбинантные клеточные линии могут быть созданы методом трансфекции реципиентных клеток и последующей селекции клеток, получивших наибольшее количество копий целевых генов. Получаемые в результате клеточные линии могут быть охарактеризованы и использованы в качестве тест-объектов для оценки специфического связывания меченных радионуклидами препаратов антител, их производных, а также специфических лигандов иной природы.

В качестве модельного объекта нами была выбрана пара антиген–антитело, в которой молекулярной мишенью служил эндоглин (CD105) человека, а моноклональные антитела (моноАТ) против его эпитопов взяты за основу для создания радиоиммуноконъюгатов. Выбор CD105 в качестве мишени был продиктован в первую очередь тем, что эндоглин, будучи корцептором рецепторного комплекса трансформирующего фактора роста TGF β , определяет состояние покоя или пролиферации клеток сосудистого эндотелия. Эта молекула считается маркером активированного эндотелия. Так, в процессе ангиогенеза плотность молекул CD105 на эндотелии возрастает на несколько порядков. Именно поэтому эндоглин рассматривают как одну из мишеней для выявления очагов опухолевого ангиогенеза, а также как возможную мишень для антиангиогенной терапии опухолей [5–10]. Экспрессия эндоглина на обращенной в просвет сосуда поверхности эндотелия обеспечивает быстрое накопление метки в сосудистой сети опухоли и позволяет применять изотопы с коротким периодом полураспада.

Панель моноАТ, распознающих разные эпитопы молекулы CD105, была создана и исследована в нашей лаборатории [11]. Всего получено 9 моноАТ, которые распознают разные неперекрывающиеся эпитопы CD105 на клетках эндотелия; два из них (названные 2С8 и 4С9) использованы в проведенном исследовании.

Цель работы состояла в получении рекомбинантных клеток, экспрессирующих на мембране CD105 в высокой плотности, и в испытании их в качестве тест-объектов для *in vitro* опреде-

ления ИРФ меченных радионуклидами моноАТ и их фрагментов.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Клеточные линии и условия культивирования

Клетки глиомы крысы С6 [12], линии клеток карциномы молочной железы человека МСF-7, карциномы поджелудочной железы человека М1А РаСа-2 и меланомы человека MeWo были получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии Российской академии наук и Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева, Россия). Для упаковки ретровирусного вектора и продукции псевдовирусных частиц, способных инфицировать клетки мышей и крыс, использовали клеточную линию Platinum-E (Cell Biolabs, Inc., США). Имortalizованная клеточная линия эндотелия человека EA.hy926 была предоставлена профессором И.С. Фрейдлин (Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург) с любезного разрешения автора [13]. Первичные культуры мезенхимных стромальных клеток жировой ткани были получены в нашей лаборатории и описаны ранее [14, 15].

Все клеточные культуры растили на среде DMEM/F12 или DMEM/F12/NEPES (“БиолоТ”, Россия) с добавлением 5–10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, Thermo Fisher Scientific, США; BioWest, Франция). Ростовая среда для клеток EA.hy926 дополнительно содержала 0.5 мкМ аминоптерина, 16 мкМ тимидина и 100 мкМ гипоксантина (Sigma-Aldrich, США). В культуральную среду для клеток Platinum-E добавляли селективные антибиотики: 1 мкг/мл пуромидина (Gibco, Thermo Fisher Scientific) и 10 мкг/мл бластицидина (Sigma-Aldrich; Merck, Германия) — для стабильной продукции ретровирусов.

Все перечисленные клетки растили в виде монослойных культур в пластиковых флаконах Orange Scientific (Бельгия), Nunclon Delta (США), Jet Biofil (Китай) при 37°C, 6% CO₂, во влажной атмосфере. Для снятия клеток с поверхности флаконов при пересевах использовали раствор трипсина с версеном (“БиолоТ”, Россия).

Получение кДНК

Тотальную РНК из клеток выделяли с помощью TRIzol Reagent (Life Technologies, США) согласно рекомендациям производителя. Качество РНК оценивали в соответствии с общепринятыми требованиями. Синтез кДНК проводили на выделенной РНК методом обратной транскрипции с использованием random-праймеров и ревертазы M-MuLV RNase⁻ (“СибЭнзим”, Россия). Реакционная смесь включала 500 нг РНК, 40 ед. M-MuLV, 1 мМ dNTPs, 0.2 мкг random-прайме-

Таблица 1. Праймеры, использованные для амплификации кДНК *ENG*
Table 1. Primers used for amplification of *ENG* cDNA

Праймер	Последовательность (5'→3')
Forward	ATAGGATCCGATATGGACCGCGGCACGCTCCCTCTGG
Reverse	GATACGAATTCCTATGCCATGCTGCTGGTGGAGCAGGGGGTGC

Примечание: Полужирным шрифтом выделены сайты рестрикции нуклеаз *Bam*HI и *Eco*RI. Подчеркнуты последовательности, комплементарные открытой рамке считывания CD105.

Note: *Bam*HI and *Eco*RI nuclease restriction sites are in bold. Sequences complementary to the CD105 open reading frame are underlined.

Таблица 2. Праймеры, использованные для ПЦР в реальном времени
Table 2. Primers used for real-time PCR

Праймер	Последовательность (5'→3')
<i>ENG</i> -Forward	CGGGTCTCAAGACCAGGAAG
<i>ENG</i> -Reverse	GAGGAAGGCACCAAAGGTGA

ров, 20 ед. ингибитора РНКаз RiboLock RNase inhibitor (Thermo Fisher Scientific) и деионизированную воду. Реакцию обратной транскрипции проводили в соответствии с рекомендациями производителя фермента.

Получение линии клеток С6 глиомы крыс, экспрессирующей CD105 человека

На основе последовательности, взятой из банка аннотированных нуклеотидных последовательностей GenBank NM_001114753.3 (GenBank NCBI, США), подбирали праймеры для амплификации кДНК, кодирующей полноразмерную мембранную форму CD105 человека. В состав праймеров были введены сайты рестрикции для эндонуклеаз *Bam*HI и *Eco*RI (табл. 1).

В качестве матрицы использовали кДНК клеток, экспрессирующих CD105. Амплифицированную последовательность кДНК клонировали в самоинактивирующийся бицистронный ретровирусный вектор pQCXIP (Clontech, США), содержащий ген устойчивости к пуromицину. Сравнение результатов секвенирования встроенного в рекомбинантную плазмиду pQCXIP гена *ENG* человека с соответствующей аннотированной последовательностью кДНК и поиск мутаций выполнены с помощью программы BioEdit.

Клетки Platinum-E, используемые для “упаковки” вирусных частиц, за 24 ч до трансфекции пересеивали из расчета 6×10^4 клеток/см² в среду без антибиотиков, содержащую 5% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, инактивированной нагреванием (1 ч при 56°C). Затем, используя кальций-фосфатный метод с добавлением хлорохина, клетки трансфицировали рекомбинантной плазмидой (1.25 мкг плазмидной ДНК на 1 мл ростовой среды). Культуральную жидкость, содержащую ретровирусные частицы, собирали через 24, 48 и 72 ч,

пропускали через 0.45-микрометровые PES-фильтры (Jet Biofil, Китай), смешивали с равным объемом ростовой среды, добавляли 8 мкг/мл полибрана (Merck Millipore, США) и заливали в ячейки 12-луночного планшета, содержащие монослой клеток С6. В вирусодержащей среде клетки культивировали 24 ч, после чего заменяли среду на новую такого же состава. Всего проводили 3 цикла замены среды, после чего начинали селекцию трансдуцированных клеток. Для этого в ростовую среду добавляли пуromицин (Gibco) до концентрации 1.5 мкг/мл, два раза в неделю селективную ростовую среду заменяли, постепенно в течение трех недель повышая концентрацию пуromицина до 10 мкг/мл.

Оценка экспрессии гена ENG методом ПЦР в реальном времени

Последовательности праймеров для оценки уровня экспрессии гена *ENG* в клетках заимствованы из банка праймеров Harvard Medical School (США) (табл. 2).

ПЦР в реальном времени проводили в объеме 25 мкл в 96-луночных планшетах. В реакции использовали 0.5 мкл полученной кДНК, заранее подобранные концентрации праймеров в диапазоне 200–300 нМ, 0.8 мМ dNTPs, 4 мМ MgCl₂, 1 ед. Hot-start Taq-ДНК-полимеразы, буфер для Hot-start Taq-ДНК-полимеразы, 1 мкл SYBR Green и деионизированную воду. После денатурации при 95°C в течение 10 мин проводили 40 циклов амплификации в следующем режиме: плавление при 95°C в течение 30 с → отжиг при 56°C в течение 30 с → элонгация при 72°C в течение 30 с.

Уровни экспрессии генов рассчитывали в виде разницы (ΔCt) между пороговым циклом исследуемого гена и референс-гена “домашнего хозяйства” *GAPDH*.

Проточная цитофлуориметрия

Экспрессию эндоглина на клеточных мембранах выявляли с помощью проточной цитофлуориметрии, используя меченные фикоэритрином антитела против CD105 (BD Biosciences, США). Для выявления HER2/neu на клетках опухолей использовали меченные фикоэритрином антитела (BioLegend, США). Изотипическим контролем служили меченные фикоэритрином мышинные антитела (BD Biosciences). Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSAriaIII с использованием программного обеспечения BD FACSDiva Software version 7.0 (BD Biosciences).

Моноклональные антитела против эндоглина

В работе использовали два из созданных в лаборатории моноАТ против эндоглина человека (2С8 и 4С9), которые распознают на клетках эндотелия два разных неперекрывающихся конформационных эпитопа молекулы CD105 [11]. Fab-фрагменты получали из моноАТ 2С8 путем ферментативного расщепления и последующей очистки методом хроматографии на Protein А-сефарозе.

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток

Клетки высевали на покровные стекла, погруженные в чашки Петри, залитые ростовой средой. По достижении клетками 50–60%-ной конfluence стекла отмывали от ростовой среды и инкубировали в растворе меченных изотиоцианатом флуоресцеина (ФИТЦ) моноАТ против CD105, трижды отмывали от несвязавшихся антител и фиксировали. Ядра докрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI; Sigma). Препараты анализировали с помощью люминесцентного микроскопа AxioScope.A1, оборудованного камерой AxioCam MRm, с использованием программного обеспечения AxioVision Rel. 4.8 Software (Carl Zeiss AG, Германия).

Мечение антител радиоактивными изотопами

Для введения в молекулы антител и их Fab-фрагментов изотопов ^{68}Ga или ^{89}Zr белки модифицировали бифункциональными хелатирующими агентами на основе дефероксамина (ДФО). Были испытаны два производных ДФО: коммерчески доступный *p*-NCS-Bz-ДФО (ДФО-NCS; Chema-tech, Франция) и ДФО-этилскварат (ДФО-Sq), синтез которого проводили по ранее описанным методикам [16, 17]. Эти ДФО-производные присоединяли к белковым молекулам по первичным аминогруппам путем инкубации 1–2 мг белка в 50 мМ боратном буфере (pH 8.5–8.8) с 10-кратным мольным избытком производных ДФО в течение 17 ч при комнатной температуре. Модифицированные белки очищали методом гель-фильтрации

онной хроматографии в 50 мМ аммоний-ацетатном буфере (pH 7.5), а целевую фракцию элюата концентрировали ультрафильтрацией.

Для введения в молекулу белка метки ^{68}Ga в микропробирку со 100 мкл 50 мМ аммоний-ацетатного буфера (pH 7.5) вносили 50–100 мкг модифицированного белка и затем 100 мкл раствора $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ (50–100 МБк) в 0.1 М соляной кислоте. Смесь инкубировали в течение 15 мин в термощейкере в присутствии кислорода воздуха при 37°C и скорости перемешивания 1000 об/мин.

Для введения метки ^{89}Zr в микропробирку с 500 мкл 0.5 М HEPES-буфера (pH 7.2) вносили 150–200 мкг ДФО-модифицированного белка и затем 25 мкл раствора $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{ZrCl}_4$ (2–4 МБк) в 5 М соляной кислоте. Реакционную смесь инкубировали в течение 15 мин в термощейкере в присутствии кислорода воздуха при 37°C и скорости перемешивания 1000 об/мин.

Радиохимическую конверсию реакции определяли методами радио-тонкослойной хроматографии и гель-фильтрационной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Во всех случаях радиохимическая конверсия превышала 95%.

Определение иммунореактивной фракции меченных радиоизотопами антител

Определение значения ИРФ радиоиммуноконъюгатов проводили *in vitro* по методу, описанному T. Lindmo и др. [18]. Эксперименты выполняли на взятых из культуры или размороженных *ex tempore* живых клетках. В обоих вариантах клетки суспендировали в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина и 0.02% NaN_3 . Число клеток определяли с помощью кондуктометрического счетчика Z1 Coulter Counter (Beckman Coulter, США) и оценивали жизнеспособность, используя раствор трипанового синего (“БиолоТ”). В пробирках типа Eppendorf готовили ряд проб с убывающим содержанием клеток в суспензии: от 4×10^6 до 1×10^5 . Все манипуляции с клетками проводили при 4°C. Для контроля специфичности связывания одну, максимальную по числу клеток, пробу предварительно инкубировали с немечеными одноименными антителами, взятыми в 100-кратном избытке по сравнению с концентрацией меченных радионуклидом антител. Затем во все пробирки с клетками вносили меченные радионуклидом антитела или их фрагменты. Готовили одну дополнительную пробу с мечеными антителами, которая не содержала клеток. Эту пробу, называемую тотальной, оставляли без изменений до момента определения радиоактивности. Образцы клеток инкубировали в течение 1 ч с мечеными антителами, затем трижды освобождали от несвязавшихся антител центрифугированием при 300 g в течение 4 мин. Радиоактивность проб опре-

деляли с помощью радиометра активности радионуклидов Curiementor 3 (PTW-Freiburg, Германия). Радиоактивность измеряли как число импульсов/мин (срм).

По результатам измерения радиоактивности строили график зависимости, в котором по оси абсцисс откладывали величину, обратную концентрации клеток в пробах (мл/10⁶ клеток), а по оси ординат – отношение T/B , где T – радиоактивность (срм) меченых антител в пробе, B – радиоактивность меченых антител, специфически связавшихся с антигеном на клетках. ИРФ определяли как долю меченых антител, связавшихся с клетками, по формуле: $ИРФ = (1/intercept) \times 100$, где $intercept$ – точка пересечение прямой с осью ординат.

При работе с изотопом ⁶⁸Ga, период полураспада которого составляет 68 мин, все измеренные значения радиоактивности пересчитывали на время измерения первого образца (в нулевой временной точке) по формуле: $A_t = A_0 e^{-\lambda t}$, где A_0 – радиоактивность образца в нулевой точке, A_t – радиоактивность образца, измеренная через t мин после начала измерения (первого образца), λ – постоянная распада изотопа ⁶⁸Ga (–0.010237).

Определение числа молекул CD105 на клетках

Определение среднего числа молекул CD105 на клетках проводили *in vitro* по протоколу, аналогичному описанному выше для определения ИРФ. Однако в этом случае количество антигена (численность клеток) было величиной постоянной, а концентрация меченых радионуклидом антител – переменной. При анализе результатов строили график зависимости содержания меченых антител (в нг) в пробе от измеренного значения радиоактивности (в срм). По полученной графической зависимости рассчитывали минимальное содержание меченых антител, необходимое для связывания всех молекул CD105. Полученное массовое значение для антител переводили в число молекул и, разделив на число клеток, определяли среднее значение числа CD105 на клетку.

Статистические методы обработки результатов

Все приведенные в статье эксперименты по оценке количества рецепторов на клетках, а также по оценке ИРФ были выполнены в 3–5 повторах; в тексте приведены средние значения со стандартными отклонениями (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью создания рекомбинантных клеток, на поверхности которых экспрессированы молекулы эндоглина человека, мы воспользовались ре-

зультатами ранее проведенного исследования по экспрессии гена *ENG* в линиях опухолевых клеток разного гистогенеза и в культурах нетрансформированных клеток [19]. Мезенхимные стромальные клетки из жировой ткани использованы в качестве донора мРНК эндоглина, с которой методом обратной транскрипции синтезировали кДНК. В качестве реципиентов гена *ENG* использованы культивируемые клетки линии С6 глиомы крыс. Это монослойная культура с высокой пролиферативной активностью (время удвоения 8 ч), не экспрессирующая эндоглин (рис. 1). С помощью ретровирусной трансдукции в геном клеток С6 был введен ген *ENG* и проведен отбор рекомбинантных клеток на селективном антибиотике – пурамицине. Экспрессию CD105 на клетках исследовали методом проточной цитофлуориметрии, используя меченные фикоэритрином антитела против CD105. Проанализировано пять отдельных культур. Три культуры были негомогенными и содержали популяции клеток, значительно различающиеся по плотности молекул-мишеней на мембране, о чем судили по интенсивности флуоресценции клеток, связавших меченные флуорохромом антитела (рис. 1). Несколько культур были представлены одной клеточной популяцией, имеющей высокую плотность CD105 на поверхности (рис. 1). Одна из этих культур была охарактеризована и отобрана для дальнейшей работы. Полученная линия клеток обозначена как С6-ENG.

Стабильность экспрессии эндоглина этими клетками при культивировании в присутствии селективного антибиотика исследовали путем последовательного пересева клеток. Установлено, что в течение 2 мес, за которые было выполнено 13 пассажей культуры на среде, содержащей пурамицин, $99.80 \pm 0.19\%$ клеток сохраняли исходный высокий уровень CD105 на мембране (рис. 1). При культивировании клеток в отсутствие селективного антибиотика уже на 7 пассаже появилась популяция, отличавшаяся меньшей плотностью молекул-мишеней, чем исходные клетки (рис. 1).

Свойства клеток С6-ENG сравнили с характеристиками базовых клеток линии С6 [12, 20], а также с клетками эндотелия человека линии EA.hy926. Клетки EA.hy926 представляют собой стабильную линию, полученную в результате гибридизации клеток эндотелия пупочного канатика HUVEC и клеток карциномы легкого A549 [13]. Клетки EA.hy926 обладают важнейшими чертами клеток сосудистого эндотелия человека, и их широко используют в качестве модельного объекта при исследовании анти- и проангиогенной активности препаратов [21–23].

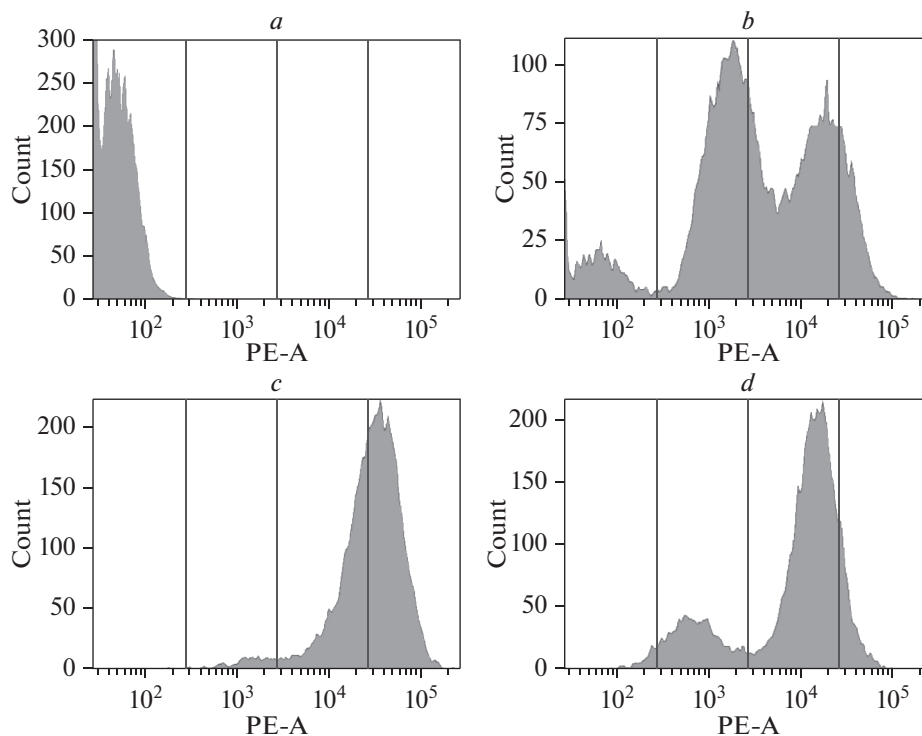


Рис. 1. Исследование методом проточной иммуноцитофлуориметрии экспрессии CD105 на клетках линии глиомы крыс С6 (а), на гетерогенных (b) и гомогенных (с) культурах рекомбинантных клеток, экспрессирующих CD105. Стабильность экспрессии CD105 клетками С6-ENG при культивировании в присутствии пурамицина (13 пассаж) (с) или в его отсутствии (7 пассаж) (d). По оси абсцисс — условные единицы интенсивности флуоресценции, по оси ординат — число клеток.

Fig. 1. Flow cytometry study of CD105 expression on C6 rat glioma cells (a), on heterogeneous (b) and homogeneous (c) cultures of recombinant cells expressing CD105. Stability of CD105 expression by C6-ENG cells when cultured in the presence of puromycin (13 passages) (c) or in its absence (7 passages) (d). The X-axis is fluorescence intensity units, the Y-axis is the number of cells.

Клетки С6-ENG в культуре имели фибробластоподобную форму, росли в виде монослоя и по этим параметрам не отличались от исходных родительских клеток С6 (рис. 2). Они обладали такими же ростовыми характеристиками, как исходные клетки: время удвоения культуры составляло 8.2 ± 0.5 ч. Клетки С6-ENG, в отличие от исходных клеток, несли на мембране эндоглин человека, что было продемонстрировано методом иммунофлуоресценции клеток, выращенных на покровных стеклах (рис. 2).

Как видно из результатов иммуноцитофлуориметрического анализа, представленных на рис. 3, на клетках С6-ENG рецепторов CD105 значительно больше, чем на клетках эндотелия EA.hy926. Методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией показано, что ΔCt для клеток эндотелия EA.hy926 составляет 5.6 ± 0.03 , а для клеток линии С6-ENG — 0.66 ± 0.01 . Этот результат свидетельствовал о многократно более высокой экспрессии гена *ENG* в рекомбинантных клетках, чем в линии клеток эндотелия.

Число молекул CD105 на поверхности клеток определяли с использованием меченных изотопом ^{68}Ga моноАТ 4С9 против эндоглина. На поверхности клеток EA.hy926 присутствовало в среднем 1.12×10^5 молекул CD105, а на клетках С6-ENG — 1.33×10^6 . Таким образом, на рекомбинантных клетках С6-ENG экспрессировано на порядок больше молекул-мишеней для моноАТ 4С9, чем на клетках эндотелия линии EA.hy926.

Первые же эксперименты по тестированию меченных ^{68}Ga анти-CD105-моноАТ показали, что при равных концентрациях антител и клеток радиоактивный сигнал от рекомбинантных клеток был в 3 раза выше полученного от клеток эндотелия (рис. 4).

Ниже приведены примеры использования рекомбинантных клеток С6-ENG для оценки ИРФ радиоиммуноконъюгатов. В процессе создания меченных изотопом ^{68}Ga препаратов антител и их Fab-фрагментов сравнивали эффективность использования двух хелатирующих соединений: DFO-NCS и DFO-Sq. При обработке результа-

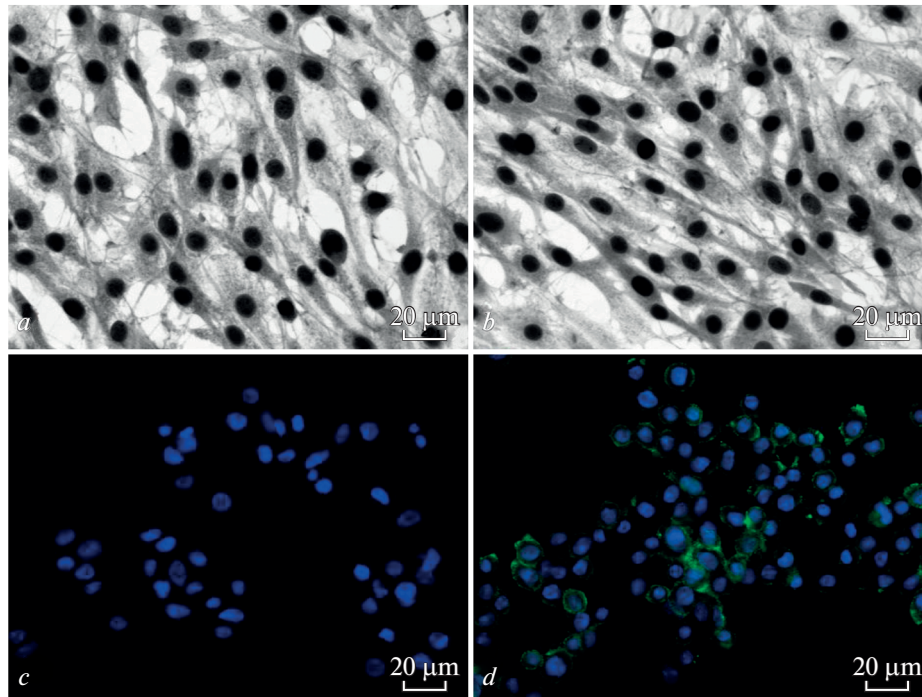


Рис. 2. Сравнительный анализ клеток C6 (*a, c*) и C6-ENG (*b, d*). Морфология клеток C6 (*a*) и C6-ENG (*b*) в культуре (окраска гематоксилином и эозином). Иммунофлуоресцентная детекция CD105 на поверхности клеток C6 (*c*) и C6-ENG (*d*) с помощью ФИТЦ-меченых моноАТ 2С8; ядра клеток окрашены DAPI.

Fig. 2. Comparison of the properties of the parental C6 line cells (*a, c*) and recombinant C6-ENG cells (*b, d*). Morphology of C6 (*a*) and C6-ENG (*b*) cells in culture (hematoxylin and eosin staining). Immunofluorescent detection of CD105 on the membranes of C6 (*c*) and C6-ENG (*d*) cells using FITC-labeled mAbs 2C8; the nuclei are counterstained with DAPI.

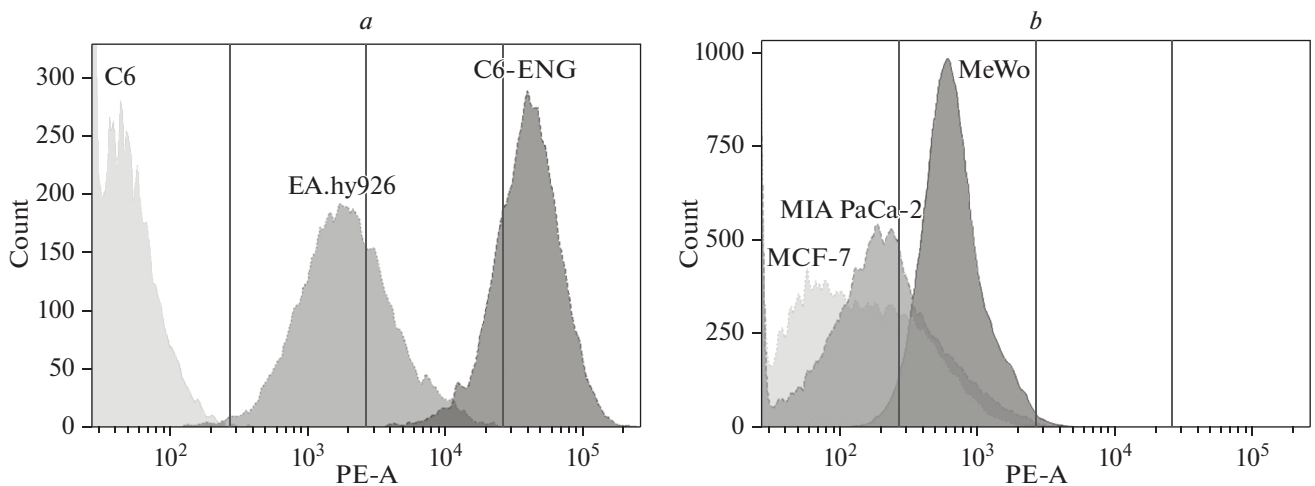


Рис. 3. Анализ методом проточной иммуноцитофлуориметрии экспрессии CD105 на клетках EA.hy926, C6 и C6-ENG (*a*), а также HER2/neu на опухолевых клетках линий MCF-7, MIA-PaCa-2 и MeWo (*b*). По оси абсцисс – условные единицы интенсивности флуоресценции, по оси ординат – число клеток.

Fig. 3. Flow cytometry study of CD105 expression on EA.hy926 endothelial cells, rat glioma C6 cells, and cells of recombinant C6-ENG strain (*a*) and HER2/neu expression on MCF-7, MIA-PaCa-2, and MeWo (*b*) tumor cells. The X-axis is fluorescence intensity units, the Y-axis is the number of cells.

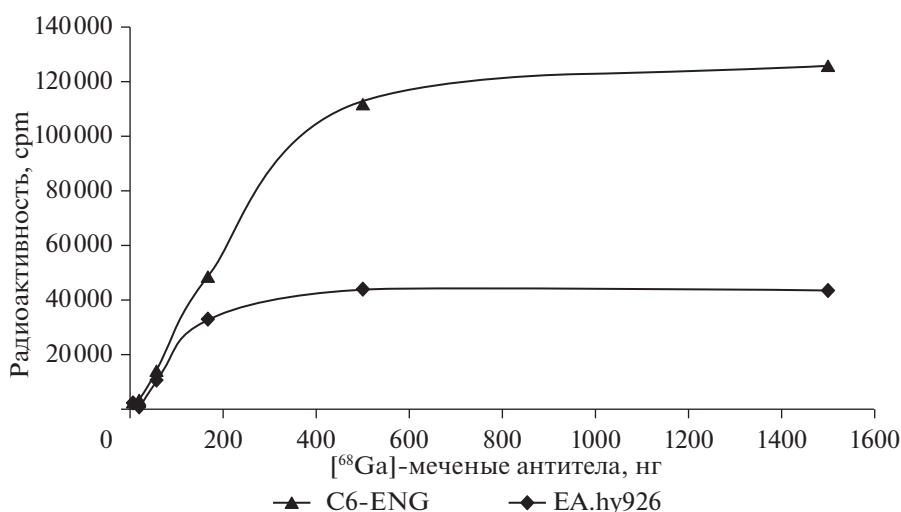


Рис. 4. Связывание меченных $[^{68}\text{Ga}]$ -моноАТ 4С9 с молекулами CD105 на клетках C6-ENG и EA.hy926. Число клеток во всех пробах – 2×10^6 .

Fig. 4. $[^{68}\text{Ga}]$ -labeled 4C9 mAbs binding to CD105 molecules on C6-ENG and EA.hy926 cells. The number of cells in all samples is 2×10^6 .

тов, полученных при измерении радиоактивности проб, сначала определяли отношение радиоактивности фракции $[^{68}\text{Ga}]$ -Fab-2C8, связанной с клетками C6-ENG, к общей радиоактивности пробы (рис. 5). Затем, используя двойные обратные координаты по методу Lindmo и др. [18], определяли величину ИРФ. Для препарата $[^{68}\text{Ga}]$ -Fab-2C8, полученного на основе модификации с использованием DFO-NCS, значение ИРФ составило 42.4%, тогда как применение DFO-Sq позволило создать конъюгат со значительно более высоким уровнем специфической активности – ИРФ, равной 73.3%. На основании этого результата в последующих экспериментах в качестве металл-хелатирующего агента использовали DFO-Sq.

Клетки C6-ENG также использовали для сравнения свойств радиоиммуноконъюгатов, полученных из моноАТ 2C8 (180 кДа) и из Fab-фрагментов 2C8 (55 кДа) (рис. 5). Показано, что значения ИРФ для обоих препаратов были сходными. Для $[^{68}\text{Ga}]$ -моноАТ 2C8 величина ИРФ составляла $72.6 \pm 19.8\%$, а для Fab-2C8 – $79.9 \pm 22.1\%$. Для моноАТ 2C8, меченных радионуклидом ^{89}Zr , значение ИРФ составило $64.0 \pm 15.9\%$, а для моноАТ 4C9 – $67.4 \pm 18.7\%$. На основании полученных результатов можно говорить о пригодности использованного метода получения радиоиммуноконъюгатов для обоих моноАТ.

В результате проведенного исследования созданы рекомбинантные клетки, экспрессирующие CD105 в количестве, существенно превышающем таковое на стабильных клеточных линиях челове-

ка, и продемонстрирована возможность их использования для *in vitro* тестирования специфической активности меченных радионуклидами анти-CD105-антител и их производных.

На основании накопленного ранее опыта работы с культурами нативных линий опухолевых клеток мы пришли к выводу о ряде свойственных им ограничений. Во-первых, плотность молекул-мишеней на мембране культивируемых опухолевых клеток, как правило, недостаточна для количественной оценки ИРФ. Например, при скрининге 19 линий опухолевых клеток на экспрессию молекул HER2/neu наибольшая плотность этого рецептора, выявленная нами на клетках меланомы MeWo (рис. 3), составила всего 5–10 тыс. на клетку. Аналогично S. Sharma и соавт. [24] сообщали, что для тестирования меченных радионуклидами лигандов при низкой плотности мишеней на клетках (10–14 тыс.) необходимо 4.5×10^8 клеток, в то время как при использовании клеток, на поверхности которых экспрессировано $(1-2) \times 10^6$ молекул-мишеней, достаточно на порядок меньше клеток – 10^7 .

Кроме того, при работе с опухолевыми клетками разного гистогенеза нам далеко не всегда удавалось приготовить одноклеточную суспензию, что затрудняло определение ИРФ. Это явление мы наблюдали, когда клетки росли в виде крупных агрегатов, например в культуре В-лимфобластоидных клеток RPMI-1788, клеток рака предстательной железы LNCaP или клеток ретинобластомы Y-79. В ряде случаев возникали трудности при снятии опухолевых клеток, несущих молекулярные маркеры, с поверхности культуральных флаконов, с

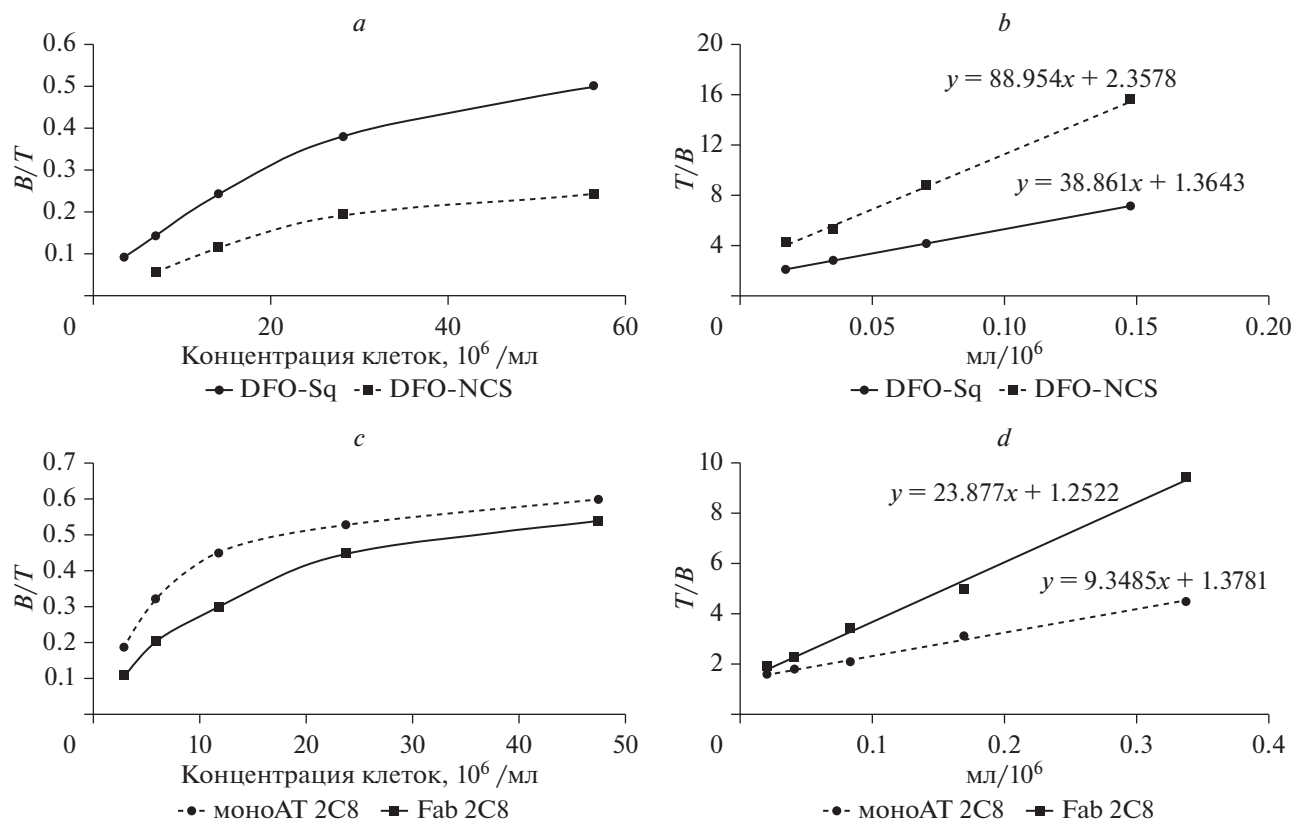


Рис. 5. Определение ИРФ меченных изотопом ^{68}Ga моноАТ 2С8 и Fab-2С8. ИРФ радиоиммуноконъюгатов $[^{68}\text{Ga}]$ -Fab-2С8, приготовленных с использованием разных хелатирующих соединений (а, б). Сравнение ИРФ радиоиммуноконъюгатов $[^{68}\text{Ga}]$ -2С8 и $[^{68}\text{Ga}]$ -Fab-2С8, приготовленных с помощью DFO-Sq (с, д). Отношение радиоактивности меченных ^{68}Ga препаратов, связавшихся с CD105 на клетках, к общей радиоактивности пробы (а, с). Определение ИРФ в двойных обратных координатах по методу Lindmo (б, д). B – радиоактивность клеток, T – общая радиоактивность пробы.

Fig. 5. Determination of the IRF of ^{68}Ga labeled 2C8 and Fab-2C8 mAbs. The IRF of $[^{68}\text{Ga}]$ -Fab-2C8 radioimmunoconjugates prepared using different chelating compounds (a, b). Comparison of IRF of $[^{68}\text{Ga}]$ -2C8 and $[^{68}\text{Ga}]$ -Fab-2C8 mAbs prepared using DFO-Sq (c, d). Ratio of radioactivity of $[^{68}\text{Ga}]$ -labeled preparations bound to CD105 on cells to the total radioactivity of the sample (a, c). Determination of IRF in double inverse coordinates using the Lindmo method (b, d). B is the radioactivity of the cells, T is the total radioactivity of the sample.

чем мы столкнулись при работе с рядом карцином – например, с клетками карциномы поджелудочной железы Саран-2.

Дополнительное преимущество рекомбинантных клеток при использовании в качестве тест-объектов заключается в том, что технология их создания позволяет получать и отбирать клетки, несущие разное количество молекул-мишеней; причем именно по этому параметру рекомбинантные клетки могут быть охарактеризованы и стандартизированы.

В представленной работе в качестве меченных радионуклидами лигандов использовали моноАТ против эндоглина и полученные из них Fab-фрагменты. Однако рекомбинантные клетки, аналогичные описанным в работе, могут быть использованы в качестве тест-объектов для оценки не только антител, но и других лигандов, таких как аптамеры,

миметики антител DARPin (designed ankyrin repeat protein) и пептиды.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Госзадания Министерства здравоохранения Российской Федерации “Создание клеточных тест-объектов, предназначенных для оценки специфической активности меченных изотопами препаратов антител, их фрагментов и пептидов”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Garousi J., Orlova A., Frejd F.Y., Tolmachev V. Imaging using radiolabelled targeted proteins: radioimmunodetection and beyond. *EJNMMI Radiopharm. Chem.*, 2020, 5(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s41181-020-00094-w>

2. *Wadas T.J., Wong E.H., Weisman G.R., Anderson C.J.* Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. *Chem. Rev.*, 2010, 12, 110(5), 2858–2902. <https://doi.org/10.1021/cr900325h>
3. *Vivier D., Sharma S.K., Zegluis B.M.* Understanding the *in vivo* fate of radioimmunoconjugates for nuclear imaging. *J. Labelled Comp. Radiopharm.*, 2018, 61(9), 672–692. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3628>
4. *Carter L.M., Poty S., Sharma S.K., Lewis J.S.* Preclinical optimization of antibody-based radiopharmaceuticals for cancer imaging and radionuclide therapy – model, vector, and radionuclide selection. *J. Labelled Comp. Radiopharm.*, 2018, 61(9), 611–635. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3612>
5. *Klimovich V.B., Pinevich A.A., Smirnov I.V., et al.* Perspectives of application of antibodies against endoglin (CD105) for visualization and anti-angiogenic therapy of tumors. *Vopr. Onkol.*, 2018, 64(4), 504–507 (in Russ.). <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2018-64-4-504-507>
6. *Smirnov I.V., Gryazeva I.V., Samoilovich M.P., Klimovich V.B.* Endoglin (CD105) – a target for visualization and anti-angiogenic therapy for malignant tumors. *Vopr. Onkol.*, 2015, 61(6), 898–907 (in Russ.). PMID 26995976.
7. *Bredow S., Lewin M., Hofmann B., et al.* Imaging of tumour neovasculature by targeting the TGF-beta binding receptor endoglin. *Eur. J. Cancer*, 2000, 36(5), 675–681. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(99\)00335-4](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(99)00335-4)
8. *Lee S.Y., Hong Y.D., Felipe P.M., et al.* Radiolabeling of monoclonal anti-CD105 with ¹⁷⁷Lu for potential use in radioimmunotherapy. *Appl. Radiat. Isot.*, 2009, 67(7–8), 1366–1369. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2009.02.071>
9. *Kopczynska E., Makarewicz R.* Endoglin – a marker of vascular endothelial cell proliferation in cancer. *Contemp. Oncol. (Pozn.)*, 2012, 16(1), 68–71. <https://doi.org/10.5114/wo.2012.27340>
10. *Moghaddam N.A., Mahsuni P., Taheri D.* Evaluation of endoglin as an angiogenesis marker in glioblastoma. *Iran. J. Pathol.*, 2015, 10(2), 89–96. pmid 26351468.
11. *Smirnov I.V., Griazeva I.V., Samoilovich M.P., et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies against human endoglin. *Cell Tiss. Biol.*, 2015, 9(6), 473–482. <https://doi.org/10.1134/S1990519X15060097>
12. *Giakoumettis D., Kritis A., Foroglou N.* C6 cell line: the gold standard in glioma research. *Hippokratia*, 2018, 22(3), 105–112. pmid 31641331.
13. *Edgell C.J.S., McDonald C.C., Graham J.B.* Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80(12), 3734–3737. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.12.3734>
14. *Pinevich A.A., Samoilovich M.P., Shashkova O.A., et al.* Characteristics of mesenchymal stromal cells isolated from patients with breast cancer. *Cell Technol. Biol. Med.*, 2014, 2, 666–672. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2640-8>
15. *Pinevich A.A., Terehina L.A., Samoilovich M.P.* Comparative analysis of mesenchymal stem cells from visceral and subcutaneous adipose tissue. *Rus. J. Immunol.*, 2015, 9/18(2/2), 83–86 (in Russ.).
16. *Rudd S.E., Roselt P., Cullinane C., et al.* A desferrioxamine B squaramide ester for the incorporation of zirconium-89 into antibodies. *Chem. Commun.*, 2016, 52(80), 11889–11892. <https://doi.org/10.1039/C6CC05961A>
17. *Heskamp S., Raave R., Boerman O., et al.* ⁸⁹Zr-immuno-positron emission tomography in oncology: state-of-the-art ⁸⁹Zr radiochemistry. *Bioconj. Chem.*, 2017, 28(9), 2211–2223. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00325>
18. *Lindmo T., Boven E., Cuttitta F., et al.* Determination of the immunoreactive function of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J. Immunol. Methods*, 1984, 72(1), 77–89. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(84\)90435-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(84)90435-6)
19. *Samoilovich M.P., Pinevich A.A., Vartanyan N.L., et al.* Endoglin expression in non-tumor and tumor cells of different origin. *Cell Tiss. Biol.*, 2018, 12(6), 437–447. <https://doi.org/10.1134/S1990519X18060111>
20. *Benda P., Lightbody J., Sato G., et al.* Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, 1968, 161(3839), 370–371. <https://doi.org/10.1126/science.161.3839.370>
21. *Bouis D., Hospers G.A., Meijer C., et al.* Endothelium *in vitro*: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis*, 2001, 4(2), 91–102. <https://doi.org/10.1023/a:1012259529167>
22. *Aranda E., Owen G.I.* A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. *Biol. Res.*, 2009, 42(3), 377–389. pmid 19915746.
23. *Stolbovaya A.Y., Smirnov I.V., Pinevich A.A., et al.* The influence of monoclonal antibodies to human endoglin on the functional characteristics of EA.hy926 endothelial cells. *Cell Tiss. Biol.*, 2021, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1134/S1990519X21060109>
24. *Sharma S.K., Lyaschenko S.K., Park H.A., et al.* A rapid bead-based radioligand binding assay for the determination of target-binding fraction and quality control of radiopharmaceuticals. *Nucl. Med. Biol.*, 2019, 71, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2019.04.005>

Recombinant Cells as a Tool for Evaluating the Specific Activity of Radionuclide-Labeled Antibodies against Endoglin (CD105)

O. A. Shashkova^{a, *}, I. V. Smirnov^a, A. A. Pinevich^{a, b}, K. O. Avrov^a, L. A. Terekhina^a,
I. S. Malakhov^a, A. Yu. Stolbovaya^a, I. V. Gryazeva^a, N. L. Vartanyan^a,
I. Yu. Krutetskaya^a, D. O. Antuganov^a, S. V. Shatik^a, and M. P. Samoilovich^{a, b}

^aGranov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, 197758, Russia

^bSaint Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, Russia

*e-mail: ujinolga@yandex.ru

Abstract—One of the most important characteristics of radionuclide-labeled antibodies and their derivatives is the size of the immunoreactive fraction. Measuring this parameter requires a high density of target molecules, which is rarely achievable with tumor cells. The solution to the problem of radioimmunoconjugate testing was the creation of recombinant cells carrying human endoglin (CD105). The recipients of the endoglin gene (*ENG*) were rat C6 glioma cells, which are characterized by ease of cultivation and high transfection efficiency. The obtained C6-ENG cells carried 1.3×10^6 CD105 molecules on the membrane and were used to determine the immunoreactive fraction of ⁶⁸Ga and ⁸⁹Zr radiolabeled anti-CD105 monoclonal antibodies and their Fab-fragments. The creation of stable recombinant cell lines for *in vitro* testing of specific activity of radionuclide-labeled antibodies and their derivatives seems promising for the development of new radio-pharmaceuticals.

Keywords: monoclonal antibodies, Fab-fragments, radioisotopes, radioimmunoconjugates, immunoreactive fraction, recombinant cells, transfection, molecular targets, endoglin, CD105