

УДК 57.083.3

## ЭПИТОПНЫЙ АНАЛИЗ МЫШИНЫХ И ХИМЕРНЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, РАСПОЗНАЮЩИХ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫЙ АНТИГЕН PRAME

© 2020 г. В. А. Мисюрин<sup>1,\*</sup>, Ю. П. Финашутина<sup>1</sup>, А. А. Турба<sup>1</sup>, М. В. Ларина<sup>1</sup>,  
О. Н. Солопова<sup>1</sup>, Н. А. Лыжко<sup>1</sup>, Л. А. Кесаева<sup>1</sup>, Н. Н. Касаткина<sup>1</sup>, Т. К. Алиев<sup>3,1</sup>,  
А. В. Мисюрин<sup>2</sup>, академик РАН М. П. Кирпичников<sup>3,4</sup>

Поступило 26.12.2019 г.

После доработки 20.02.2020 г.

Принято к публикации 20.02.2020 г.

Исследована эпитопная специфичность ряда моноклональных антител, распознающих раково-тестикулярный антиген PRAME. Антитело 5D3 связывается с фрагментом, соответствующим участку 160–180 аминокислотных остатков белка PRAME. Антитела 6H8 и F11 связываются с фрагментом, соответствующему участку 180–200 аминокислотных остатков белка PRAME. После химеризации полученные антитела сохранили способность распознавать данные фрагменты белка PRAME.

**Ключевые слова:** раково-тестикулярный антиген, PRAME, эпитопный анализ, моноклональные антитела

**DOI:** 10.31857/S2686738920030166

Проблема терапии онкологических заболеваний по-прежнему остается актуальной, так как даже новейшие разработки в области персонализированной медицины оказываются не самыми эффективными и не всегда позволяют полностью излечить больного. Тем не менее, возможна разработка новых способов терапии. В частности, остается малоисследованной проблема возможности создания антител для терапии, основанной на их связывании с опухолевым антигеном PRAME.

PRAME – это раково-тестикулярный антиген (РТА), экспрессия которого наблюдается при многих онкологических заболеваниях. В числе этих заболеваний – меланома, рак легких, рак молочной железы, нейробластома, острые лейкозы и многие другие [1, 2]. В отличие от большинства РТА белок PRAME находится на мембране клетки, что было доказано в несколь-

ких исследованиях, в которых проводилась окрашивание опухолевых клеток антителами [3, 4]. Поверхностная локализация PRAME также подтверждается данными, полученными при исследовании белка ОРА гонококка, который предназначен для проникновения *Neisseria gonorrhoeae* внутрь клеток. Так, в процессе инфицирования ОРА связывается с рядом поверхностных белков, одним из которых является белок PRAME [5].

Локализация PRAME интересна тем, что у белка нет трансмембранного домена, а на поверхности отсутствуют гидрофобные участки, с помощью которых он мог бы флотировать в мембране клетки. Несмотря на это, PRAME может быть перспективной мишенью для направленной терапии. Например, Pankov [4] показал, что можно разработать антитела для терапии PRAME-экспрессирующих опухолей. Согласно этой работе, в структуре белка PRAME распознается эпитоп, включающий в себя аминокислотные остатки (а.о.) 310–331 с последовательностью RGRLLDQLLRHVMNPLETLSITN.

Поскольку направленная терапия может быть неэффективной по причине иммуноредактирования опухоли, антитело, описанное в работе Pankov et al. [4], может утратить терапевтическую эффективность в результате появления мутаций в эпитопе. Таким образом, получение моноклональных антител (мАТ), распознающих другие последова-

<sup>1</sup> ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ООО «Генотехнология», Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии имени академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской  
академии наук, Москва, Россия

<sup>4</sup> Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*e-mail: vsevolod.misyurin@gmail.com

**Таблица 1.** Узнавание фрагментов белка PRAME антителами, установленное методами Вестерн-блоттинга и иммуноферментного анализа (ИФА). “+” – зафиксировано связывание антител с фрагментом, “–” – связывание антител не зафиксировано, “н/д” – нет данных

Фрагмент PRAME	PN	PN1	PN2	PN3	PN4	PN4.3
Границы а.о. по белку	1–220	1–65	56–125	115–180	160–222	200–214
5D3	+	–	–	+	+	н/д
6H8	+	–	–	–	+	н/д
F11	+	–	–	–	+	–
G4	+	–	–	–	+	н/д
C10	+	–	–	–	+	н/д
B6	+	–	–	–	+	н/д
B2	+	–	–	–	+	н/д
G2	+	–	–	–	+	н/д
5D3chim	+	–	–	+	+	–
6H8chim	+	–	–	–	+	–
F11chim	+	–	–	–	+	–

тельности белка PRAME, может увеличить шанс излечения больных.

Целью данного исследования являлось изучение эпитопной специфичности моноклональных мышиных и полученных на их основе химерных рекомбинантных антител по отношению к раково-тестикулярному антигену PRAME.

При выполнении работы мы использовали анти-PRAME мышиные МАТ 5D3 и 6H8, ранее полученные нашей группой с помощью иммунизации рекомбинантным белком PRAME мышей линии Balb/c [6]. По аналогичной методике нами были созданы другие антитела против белка PRAME: F11, G4, C10, B6, B2 и G2. Были получены нуклеотидные последовательности, кодирующие переменные домены легких и тяжелых цепей МАТ 5D3, 6H8 и F11, на основе которых были сконструированы экспрессионные векторы для продукции химерных (мышь/человек) рекомбинантных антител IgG1 изотипа. Химерные МАТ получали методом транзientной экспрессии в клетках CHO (Chinese Hamster Ovary).

Для эпитопного анализа исследуемых антител в клетках *E.coli* экспрессировали фрагменты белка PRAME. Всего было получено 5 фрагментов белка PRAME, которые были экспрессированы в клетках независимо в составе 5 слитых рекомбинантных белков, каждый из которых содержал аминокислотную последовательность тиоредоксина и соответствующий фрагмент PRAME. В качестве контроля использовали клетки, экспрес-

сирующие только тиоредоксин (Тгх), и клетки, экспрессирующие N-концевой фрагмент белка PRAME (фрагмент PN, в составе которого находятся а.о. с 1-го по 220-й из первичной структуры природного белка PRAME) без тиоредоксина. N-концевой фрагмент белка был разбит на 4 приблизительно равные части с перекрытием на 20 аминокислотных остатков. Фрагмент PN1 включал в себя а.о. природного белка PRAME 1–65, фрагмент PN2 а.о. 56–125, фрагмент PN3 а.о. белка PRAME 115–180, фрагмент PN4 включал в себя а.о. 160–222. Пятый фрагмент белка PRAME (PN4.3) представлял собой гидрофильный полипептид KRKKNVLRLLCCKKLLK (а.о. с 200-го по 214-й из первичной структуры природного белка PRAME), который с высокой вероятностью мог быть эпитопом для исследуемых МАТ. Эпитопный анализ на первом этапе работы проводили методом Вестерн-блот. Для этого белки, содержащиеся в клеточных лизатах *E.coli*, экспрессирующих фрагменты белка PRAME, разделяли в 10%-м SDS-ПААГ [7] в восстанавливающих условиях, после чего проводили электрофоретический перенос белков на PVDF мембрану Hybond-P (GE Healthcare, Великобритания). В качестве первичных антител использовали исследуемые МАТ в концентрации 3 мкг/мл. Для детекции связывания антител с антигеном использовали пероксидазный конъюгат антитела к каппа-цепи человека 4G7 (ОАО “ВЦМДЛ”, Россия) в разведении 1 : 50 000. Результаты частичного картирования эпитопов PRAME для исследуемых МАТ методом Вестерн-блот представлены в сводной табл. 1.

Таким образом, фрагменты белка PRAME, с которыми связываются все исследованные антитела, входят в состав фрагмента PN. При этом МАТ 5D3 связывается с фрагментами PN3 и PN4, которые содержат совпадающие аминокислотные последовательности, соответствующие участку 160–180 а.о. белка PRAME. Остальные антитела связываются с фрагментом PN4, и не связываются с фрагментом PN3. Таким образом, данные антитела могут распознавать фрагмент полипептидной цепи, соответствующей структуре 180–220 а.о. белка PRAME.

Продолжая исследование, мы проверили связывающую способность полученных антител по отношению к фрагментам белка PRAME методом непрямого ИФА. Лизаты клеток *E. coli*, содержащие фрагменты белка PRAME PN3, PN4 и PN4.3 сорбировали на иммунологический планшет в концентрации 1 мкг/мл. Далее на планшет наносили серии разведений антител 5D3, 6H8, F11 и других исследуемых МАТ в диапазоне концентраций от 10 до 10 000 нг/мл с шагом 3. В качестве отрицательного контроля использовали МАТ G9. Для детекции связывания МАТ использовали антивидовой пероксидазный конъюгат антител против IgG человека в разведении 1 : 75 000 (ОАО

“ВНЦМДЛ”, Россия). Данный метод подтвердил результаты, полученные методом Вестерн-блот. Согласно полученным результатам (рис. 1), антитело 5D3 связывается с фрагментами PN3 и PN4 и не связывается с фрагментом PN4.3 в непрямом ИФА. Таким образом, распознаваемая антителом 5D3 аминокислотная последовательность лежит в пределах 160–180 а.о. белка PRAME.

Антитела, 6H8 и F11 связываются с фрагментом PN4, и не связываются с фрагментами PN3 и PN4.3 (рис. 2). Из этого следует, что антитела 6H8 и F11 распознают фрагмент белка PRAME, соответствующий участку 180–200 а.о. Таким образом, в первичной структуре белка PRAME находятся последовательности, с которыми связываются антитела 5D3, 6H8 и F11 (рис. 3).

Нами также показано, что химерные антитела 5D3 chim, 6H8 chim и F11 chim сохранили эпитопную специфичность после замены мышиных константных доменов МАТ на человеческие.

Несмотря на то, что была получена достаточно большая панель МАТ к раково-тестикулярному антигену PRAME, все они связываются с небольшим фрагментом белка. Это может объясняться тем, что проводилась иммунизация мышей одной линии Balb/c. Вследствие генетической однородности у мышей могло быть совсем небольшое количество генов, кодирующих варибельные домены антител, подходящих для выработки гуморального ответа против антигена PRAME. Тем не менее, распознаваемый эпитоп отличает созданные нами антитела от других, разработанных группой Pankov et al.

Таким образом, в данной работе был проведен эпитопный анализ панели МАТ к белку PRAME. Было показано, что исследуемые антитела распознают два разных участка белка PRAME, соответствующих фрагментам 160–180 и 180–200 а.о. последовательности белка. Исследуемые МАТ могут быть в дальнейшем использованы для создания гуманизированных антител, что даст возможность для разработки на их основе иммунотерапевтического противоопухолевого препарата. Поскольку антитела связываются с разными последовательностями, они могут быть использованы как взаимозаменяемые препараты для снижения риска развития резистентности опухоли вследствие потери одного из эпитопов.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1249 от 10.06.2019). Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60418X0204.

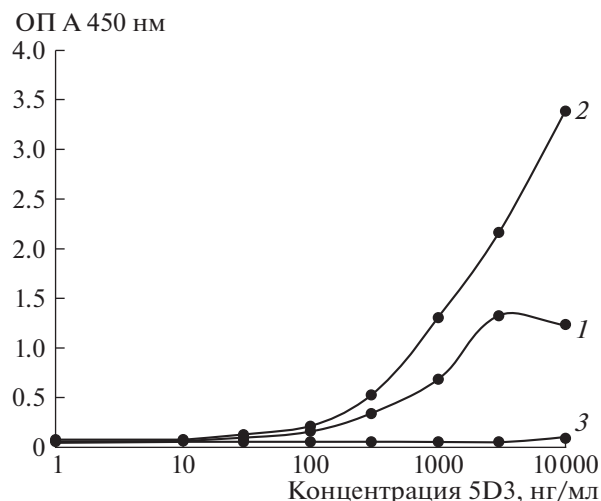


Рис. 1. Кривые титрования антитела 5D3 на сорбированных лизатах *E. coli*, экспрессирующих фрагменты PRAME. 1 – фрагмент PN3; 2 – фрагмент PN4; 3 – фрагмент PN4.3.

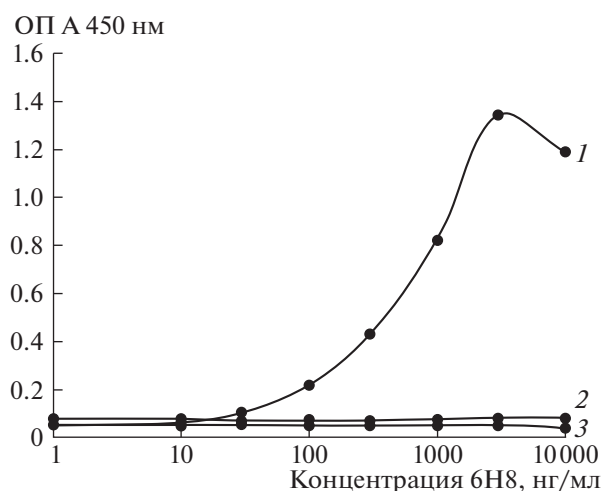


Рис. 2. Кривые титрования антитела 6H8 на сорбированных лизатах *E. coli*, экспрессирующих фрагменты PRAME. 1 – фрагмент PN4; 2 – фрагмент PN3; 3 – фрагмент PN4.3.

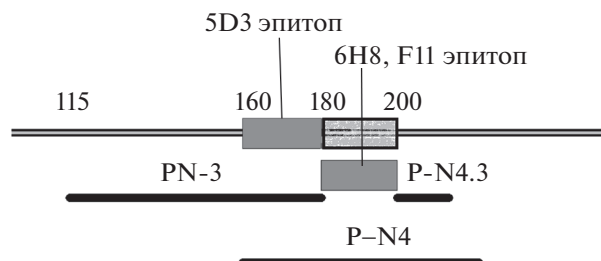


Рис. 3. Предполагаемая схема линейных эпитопов антител 5D3, 6H8 и F11 к белку PRAME.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мисюрин В.А. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2018. № 11 (1). С. 26–33.
2. Мисюрин В.А. // Иммунология. 2018. № 39 (1). С. 67–73.
3. Luetkens T., Schafhausen P., Uhlich F., Stasche T., Akbulak R., Bartels B.M., Hildebrandt Y., Gontarewicz A., Kobold S., Meyer S., Gordic M., Bartels K., Lajmi N., Cao Y., Kröger N., Bokemeyer C., Brümmendorf T.H., Atanackovic D. // *LeukRes*. 2010. V. 34 (12). P. 1647–55.
4. Pankov D., Sjostrom L., Kalidindi T., Lee S.G., Sjostrom K., Gardner R., McDevitt M.R., O'Reilly R., Thorek D.L.J., Larson S.M., Veach D., Ulmert D. // *Oncotarget*. 2017. V. 8 (39). P. 65917–65931.
5. Williams J.M., Chen G.C., Zhu L., Rest R.F. // *Mol. Microbiol.* 1998. V. 27 (1). P. 171–86.
6. Финашутина Ю.П., Мисюрин А.В., Ахлынина Т.В. и др. // Российский биотерапевтический журнал. 2015. № 14 (3). С. 29–37.
7. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.

## EPITOPE ANALYSIS OF MURINE AND CHIMERIC MONOCLONAL ANTIBODIES RECOGNIZING CANCER TESTIS ANTIGEN PRAME

V. A. Misyurin<sup>a, #</sup>, Yu. P. Finashutina<sup>a</sup>, A. A. Turba<sup>b</sup>, M. V. Larina<sup>c</sup>, O. N. Solopova<sup>a</sup>,  
N. A. Lyzhko<sup>a</sup>, L. A. Kesaeva<sup>a</sup>, N. N. Kasatkina<sup>a</sup>, T. K. Aliev<sup>c, d</sup>,  
A. V. Misyurin<sup>b</sup>, and Academician of the RAS M. P. Kirpichnikov<sup>c, d</sup>

<sup>a</sup> FSBI Research Center for Oncology named after N.N. Blokhin, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> LLC “Genotekhnologiya”, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: vsevolod.misyurin@gmail.com

We investigated the epitope specificity of different monoclonal antibodies recognizing cancer-testis antigen PRAME. Antibody 5D3 binds to the fragment of PRAME corresponding to 160–180 amino acid residues. Antibodies 6H8 and F11 bind to the fragment corresponding to 180–200 amino acid residues of PRAME. These antibodies retained the ability to recognize these PRAME fragments after chimerization.

**Keywords:** cancer testis antigen, PRAME, epitope analysis, monoclonal antibodies