

## ОЦЕНКА ИНГИБИРОВАНИЯ РОСТА ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И КИШЕЧНИКА ПРИ БЛОКИРОВАНИИ VEGFR-1 МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

© 2024 г. Т. А. Штам<sup>1,2,\*</sup>, А. В. Демьянов<sup>1,3</sup>, Л. А. Гараева<sup>1</sup>, С. С. Емельянова<sup>1</sup>, А. В. Никитина<sup>1</sup>,  
Е. Д. Путевич<sup>1,4</sup>, А. С. Потысьева<sup>1,4</sup>, М. С. Биджиева<sup>1,4</sup>, А. В. Волницкий<sup>1</sup>, В. В. Кванчиани<sup>1</sup>,  
Л. А. Соломина<sup>1,4</sup>, К. А. Шабалин<sup>1</sup>, Е. В. Сергеева<sup>1</sup>, А. П. Трашков<sup>1,2</sup>, Ж. Ю. Сидорова<sup>1</sup>,  
А. В. Жахов<sup>1,3</sup>, В. С. Бурдаков<sup>1</sup>, Н. А. Верлов<sup>1,2</sup>, А. Л. Коневега<sup>1,2,4,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра  
“Курчатовский институт”, Гатчина, Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

<sup>3</sup>Биотехнологическая компания ООО “Бенчмарк Перитум”, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: shtam\_ta@pnpi.nrcki.ru

\*\*E-mail: konevega\_al@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 28.11.2023 г.

После доработки 18.12.2023 г.

Принята к публикации 19.12.2023 г.

Рецептор-1 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR-1) играет критическую роль в опухоли-ассоциированном ангиогенезе. VEGFR-1 обнаруживается на поверхности опухолевых клеток и клеток опухолевого микроокружения. Блокирование данного рецептора приводит к подавлению пролиферации и усилению апоптоза опухолевых клеток, уменьшению васкуляризации опухоли, ингибированию выработки иммуносупрессивных цитокинов опухоль-ассоциированными макрофагами, подавлению инвазии и метастазирования опухоли. Создание препаратов моноклональных антител, блокирующих VEGFR-1, является актуальной задачей при разработке потенциальных противоопухолевых терапевтических лекарственных средств. Таргетные молекулы, созданные на основе антител, связывающихся с VEGFR-1, являются перспективной основой для создания таргетных радиотерапевтических лекарственных препаратов для диагностики и лечения злокачественных новообразований. С целью изучения терапевтического потенциала ингибирования VEGFR-1 при раках молочной железы и кишечника с помощью антител разработаны моноклональные антитела против рекомбинантного белка VEGFR-1 человека. Полученные моноклональные антитела связываются с рецептором VEGFR-1 на поверхности клеток и эффективно ингибируют пролиферацию клеток рака молочной железы и кишечника *in vitro*, уменьшают темп роста опухолевого узла *in vivo* и продлевают выживаемость мышей с привитыми опухолями.

DOI: 10.56304/S1992722324601836

### ВВЕДЕНИЕ

Рецептор-1 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR-1) представляет собой тирозинкиназный рецептор (ТКР), который связывается с членами семейства VEGF – VEGF-A, VEGF-B и фактором роста плаценты (PlGF) [1, 2]. VEGF-A также взаимодействует с VEGFR-2, ТКР, ответственным за активацию путей передачи сигнала, которые опосредуют большинство биологических эффектов VEGF-A [3, 4].

VEGFR-1 экспрессируется в эндотелиальных клетках, во время формирования и ремоделирования сосудов, макрофагах и миоэпителиальных клетках, способствуя миграции и выживанию

клеток [5–8]. Более того, он участвует в мобилизации миелоидных клеток костного мозга, генерирующих опухоль-ассоциированные макрофаги [1]. VEGFR-1 часто экспрессируется на поверхности опухолевых клеток при различных видах рака человека, его повышенная экспрессия является маркером плохого прогноза и высокой вероятности рецидива заболевания [1, 5]. В опухолевых клетках передача сигналов VEGFR-1 ингибирует апоптоз и индуцирует химиорезистентность [1, 9–11]. Помимо трансмембранной формы VEGFR-1 клетки продуцируют растворимую форму рецептора (sVEGFR-1), которая возникает в результате альтернативного сплайсинга того же

транскрипта гена [12, 13] и включает в себя первые шесть Ig-подобных доменов мембранного VEGFR-1 плюс специфическую последовательность из 31 аминокислоты в С-концевом домене. Растворимый VEGFR-1 включает в себя область связывания фактора роста мембранного VEGFR-1 (остатки 1–656) и таким образом предотвращает взаимодействие VEGF-A и PlGF с их трансмембранными ТКР [14, 15].

VEGFR-1 играет критическую роль в опухолеассоциированном ангиогенезе, но не в физиологическом ангиогенезе в отличие от VEGFR-2 [16, 17]. Помимо экспрессии в опухолевом эндотелии VEGFR-1 обнаруживается на поверхности самих опухолевых клеток и других клеток опухолевого микроокружения. Блокирование данного рецептора приводит к подавлению пролиферации и усилению апоптоза опухолевых клеток, уменьшению васкуляризации опухолевого узла, ингибированию выработки иммуносупрессивных цитокинов опухолеассоциированными макрофагами, подавлению инвазии и метастазирования опухоли.

Блокада VEGFR-1 оказывает противоопухолевую активность за счет трех различных механизмов: ингибирования опухолеассоциированного ангиогенеза путем затруднения активации эндотелия в ответ на ангиогенные факторы, высвобождаемые опухолевыми клетками (т.е. VEGF-A и PlGF); снижения мобилизации гемопоэтических предшественников из костного мозга и инфильтрации опухоли миеломоноцитарными клетками, секретирующими цитокины и проангиогенные факторы, которые в свою очередь могут способствовать агрессивности опухоли и устойчивости к терапии анти-VEGF-A; прямого воздействия на VEGFR-1-положительные опухолевые клетки путем ингибирования их инвазивности и пролиферации [18, 19].

Антиангиогенная терапия, которая до сих пор использовалась для лечения различных солидных опухолей, препятствует передаче сигналов VEGF-A, опосредованных как VEGFR-2, так и VEGFR-1 или исключительно VEGFR-2 [17, 18]. Гуманизированное моноклональное антитело (мАТ) бевацизумаб (торговые наименования: Авастин, Авегра, Б-Маб) нацелено на VEGF-A, тем самым предотвращает активацию обоих VEGFR; низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ (например, акситиниб, кабозантиниб, ленватиниб, пазопаниб, регорафениб, сорафениб, сунитиниб, вандетаниб) взаимодействуют с каталитическим доменом нескольких ТКР, включая VEGFR; а полностью гуманизированное мАТ рамуцирумаб направлено против VEGFR-2 [18, 20–22]. К сожалению, терапевтическое использование молекул, мешающих передаче сигналов VEGF-A/VEGFR-2, приводит к серьезным побочным эффектам (на-

пример, кровотечениям, задержке заживления ран, перфорациям желудочно-кишечного тракта, гипертонии, тромбоэмболическим осложнениям, протеинурии) из-за ингибирования физиологического ангиогенеза [17, 23, 24]. Ожидается, что молекулы, избирательно нацеленные на VEGFR-1, будут вызывать менее токсические эффекты, чем молекулы, направленные против VEGFR-2 или VEGF-A, поскольку PlGF способен передавать свои собственные сигналы посредством фосфорилирования остатков тирозина, отличных от тех, которые фосфорилируются при стимуляции VEGFR-1 с помощью VEGF-A [25], а VEGFR-1 не играет значимой роли в физиологическом ангиогенезе у взрослых [18].

Экспериментальные подходы, предпринимаемые до сих пор для селективного ингибирования VEGFR-1, включают в себя таргетные конъюгаты полимер-лекарственных средств, антагонистические пептиды VEGFR-1 или пептидомиметики и мАТ, блокирующие связывание лиганда с рецептором [4, 26–28]. Известно одно терапевтическое антитело против VEGFR-1, которое показало противоопухолевую активность в ряде исследований и в настоящее время проходит клинические испытания: икрукумаб (IMC-18F1) — рекомбинантное полностью гуманизированное мАТ изотипа IgG1, которое специфично и с высокой аффинностью связывается с рецептором VEGFR-1 и блокирует связывание активирующих его лигандов семейства факторов роста эндотелия сосудов: VEGF-A, VEGF-B и PlGF [18, 19]. Для создания оригинального тераностического радиофармацевтического препарата для диагностики и лечения злокачественных новообразований в настоящем исследовании выбрана стратегия разработки таргетных молекул на основе антител, связывающихся с VEGFR-1. Получены мАТ (3B12 и 4C1) против коммерчески доступного рекомбинантного белка VEGFR-1 человека. При характеристике полученных антител, в частности, изучен терапевтический потенциал блокады VEGFR-1 на моделях раков молочной железы и кишечника. Полученные мАТ имеют сродство к рецептору VEGFR-1 на поверхности клеток ряда линий, эффективно ингибируют пролиферацию опухолевых клеток рака молочной железы или кишечника *in vitro*, уменьшают темп роста опухолевого узла *in vivo* и продлевают выживаемость мышей с перевитыми опухолями.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Гибридомы, секретирующие мАТ к VEGFR-1*, получали по методу Мильштейна–Келлера. Balb/c мыши иммунизировали препаратом рекомбинантного VEGFR1 человека (RPB818Hu01, CloudClone Corp.), который представляет собой фрагмент Ser27–Ile328 внеклеточного домена VEGFR1.

После второй иммунизации проводили гибридизацию лимфоцитов паховых и брюшных лимфоузлов с миеломой мыши SP2/0. После гибридизации гибридные клоны, продуцирующие МАТ к VEGFR1, отбирали и клонировали для получения моноклонов. Полученные одиночные клоны скринировали посредством иммуноферментного анализа (ИФА), подращивали и криоконсервировали.

*Наработку моноклональных антител в асцитях* осуществляли в организме мышей линии BALB/c, которым внутривенно прививали клетки гибридом. Асцитическую жидкость объемом 3–5 мл, содержащую МАТ, отбирали и определяли в ней титр антител методом ИФА. Продукция МАТ в асцитических жидкостях мышей варьировала от 1 до 2 мг/мл.

*Выделение и очистка моноклональных антител.* Полученную асцитическую жидкость осветляли центрифугированием, после чего антитела выделяли из супернатанта осаждением с помощью сульфата аммония. Очистку МАТ проводили с помощью аффинной хроматографии с использованием сорбента с белком А. Полученный раствор МАТ концентрировали ультрафильтрацией и растворяли в Na-фосфатном буфере. Концентрацию антител определяли с помощью спектрофотометрии. Чистоту и гомогенность полученного продукта оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

*Тестирование моноклональных антител.* Изотип тяжелых цепей полученных МАТ исследовали методом непрямого твердофазного ИФА с использованием набора реактивов Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (SigmaAldrich, категория № ISO2-1KT). Специфичность полученных МАТ к VEGFR1 ортолога мыши исследовали с помощью ИФА с использованием рекомбинантного антигена мыши VEGFR1 (Mus musculus, Ser27~Val329, Cloud-Clone Corp. RPB818Mu01). Анализ конкуренции связывания с VEGFR1 полученных МАТ и контрольного рекомбинантного антитела – икрукумаб проводили с помощью конкурентного ИФА.

*Культуры клеток.* В работе использовали панель культур клеток рака молочной железы (РМЖ) – MCF-7, MDA-MB-231 и кишечника (РК) – Hutu-80, SW-480, LoVo человека, а также линии клеток РМЖ – EMT-6 и РК – CT-26 мыши. Линии клеток культивировали в полной среде DMEM-F12 (Биолот, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HiMedia, Индия) и 0.5% гентамицина при 37°C в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub>.

*Выделение тотальной РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени.* Монослой клеток заливали реагентом ЛИРА (LRU-100-50, Biolabmix, Россия), инкубировали 10 мин. Далее тотальную РНК выделяли

согласно инструкции производителя. Концентрацию тотальной РНК в образцах изменяли с помощью спектрофотометра NanoDrop One (Thermo FS, США). Для деградации геномной ДНК тотальную РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo FS, США), 4 единицы на 40 мкл реакционной смеси при 37°C в течение 40 мин. Экспрессию генов VEGF-A и VEGFR-1 оценивали с помощью ОТ-ПЦР. Для реакции использовали набор Genta Single-tube RT-PCR-мастер-микс (RT-M-003 GenTerra, Россия). Реакционная смесь (25 мкл) содержала однократную мастер-микс, 375 нМ прямого, обратного праймера и зонда (табл. 1) и 0.5 мкг тотальной РНК. Реакцию проводили на амплификаторе CFX96 Touch™ (BioRad, США): 30 мин при 50°C (обратная транскрипция), 15 мин при 95°C (активация полимеразы) и 45 циклов: денатурация фрагмента ДНК (95°C, 15 с), отжиг праймеров и зонда (58°C, 30 с) элонгация (72°C, 60 с). Относительную экспрессию генов определяли по значениям пороговых циклов и нормировали на экспрессию гена Actin.

*Проточная цитометрия.* Клетки опухолевых линий человека MCF-7, MDA-MB-231, Hutu-80, SW-480, LoVo, а также клетки линий мыши EMT-6 и CT-26 фиксировали 4%-ным формальдегидом. Часть клеток дополнительно обрабатывали 0.5%-ным раствором тритона для пермеабиллизации мембраны. Инкубировали с МАТ 4C1 или 3B12 (0.1 мкг/мл) 16 ч, 4°C. Окрашивали вторичными антителами anti-mouse-Alexa488 (17c01220, Hansa BioMedLife Science, Эстония, 1 нг/мл) 1 ч при 4°C и визуализировали на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter, США) при длине волны лазера 480 нм, накапливая 20000 событий.

*Анализ клеточной пролиферации в режиме реального времени.* Все эксперименты проводили с использованием инструмента xCELLigence DP (ACEA Biosciences, США). Клетки (20000 клеток/лунку) высевали в Е-планшеты 16 (ACEA Biosciences, США) и помещали в прибор xCELLigence DP (ACEA Biosciences, США) для непрерывной регистрации сопротивления на электродах. Через 24 ч среду заменяли на новую с антителами к рецептору VEGFR-1 (клоны 4C1, 3B12) или авастинном в концентрациях 1 мг/мл или их комбинацией в концентрации по 0.5 мг/мл каждого. Электрическое сопротивление регистрировали каждые 15 мин в течение 10 дней.

*Эксперименты in vivo.* Для оценки роста опухолевого узла и выживаемости на фоне введения МАТ к рецептору VEGFR-1 (3B12) на животных моделях использовали мышей-самцов линии DBA/BALB. Исследование выполнено в соответствии с правилами проведения манипуляций с лабораторными животными и с соблюдением биоэтики. Соответствующие протоколы экспериментов одобрены

**Таблица 1.** Последовательности праймеров и зондов

Мишень	Праймеры и зонды, 5'–3'
VEGF-A (человек)	GAGGCAGCTTGAGTTAAACG TTCTGTTCGATGGTGATGGTG <b>FAM-TGCAGATGTGACAAGCCGAGGC-BHQ1</b>
VEGFR-1 (человек)	TCAGCACATTCCTAGTGAG CACAGGTGGTTTTCGTATGT <b>FAM-TACTGGCTCCTGGCAGCGGCT-BHQ1</b>
VEGFR-1 (мышь)	TAGGAAAGGGCTTCTAGCCA GCTGGATATCTGGATGAGAAA <b>FAM-TCAGGTAGGGCTGGCCAAAGAC-BHQ1</b>
Actin (человек)	ATGCAGAAGGAGATCACTGC ATACTCCTGCTTGCTGATCC <b>FAM-ATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAA-BHQ1</b>
Actin (мышь)	ATGTACCCAGGCATTGCTGA TCCTGCTTGCTGATCCACAT <b>FAM-GGCTCCTAGCACCATGAAGATCA-BHQ1</b>

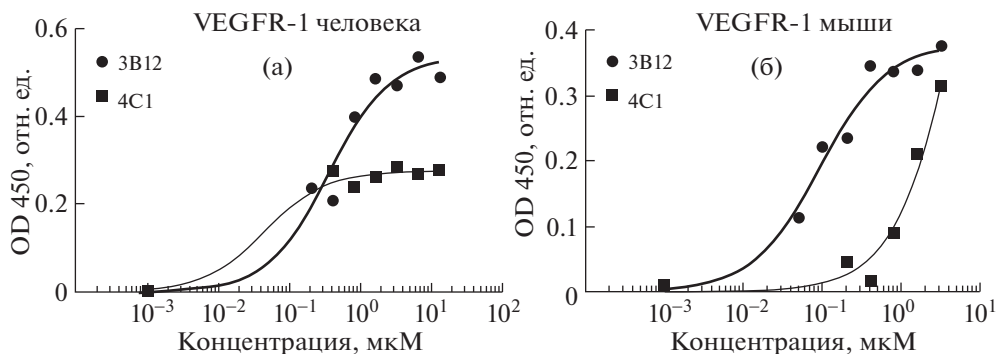
комитетом по биоэтике Отделения молекулярной и радиационной биофизики НИЦ “Курчатовский институт” – ПИЯФ. Каждой мышь подкожно вводили  $2 \times 10^5$  клеток СТ-26. Через три дня после прививки опухоли проводили внутривенное введение: PBS (контроль), мАТ (180 мг/кг), мАТ (50 мг/кг), препарата Авастин (180 мг/кг), препарата Авастин (50 мг/кг). Введения проводили 5 раз каждые трое суток. Каждая группа состояла из пяти особей. Рост узла на фоне введения мАТ к рецептору VEGFR-1 (3В12) анализировали при помощи прямых замеров опухолевых образований. Кроме размеров узла во всех группах оценивали продолжительность жизни после прививки опухолевых клеток. Временные параметры выживания мышей из экспериментальных групп сравнили с соответствующими характеристиками контрольных животных, не получавших лечения.

*Статистическая обработка результатов.* Эксперименты по анализу экспрессии *VEGFR-1*, а также пролиферации клеток проводили минимум в трех повторах. Визуализацию и анализ данных осуществляли при помощи программного обеспечения GraphPad Prism. Обработку данных проточной цитометрии и их визуализацию осуществляли при помощи плагина со свободным доступом Floreada.io. Результаты на гистограммах представлены как среднее  $\pm$  SD. Данные сравнивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с использованием теста Тьюки для поправок на множественные сравнения. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

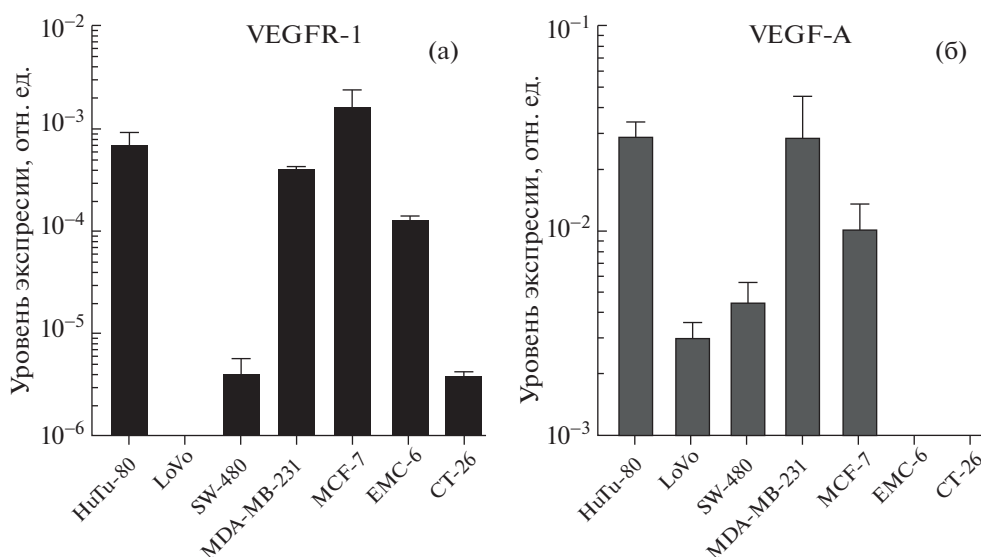
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Специфичность и связывающая активность мАТ против VEGFR-1.* Моноклональные антитела, связывающие VEGFR-1 человека, получали от мыши, иммунизированной рекомбинантным белком VEGFR-1 человека. Специфичность и эффективность связывания мАТ к VEGFR-1 человека проверяли с помощью ИФА, используя в качестве антигенов рекомбинантные белки VEGFR-1 человека и мыши. Анализ связывания показал, что оба отобранных мАТ (4С1 и 3В12) против VEGFR-1 человека обладают сильной связывающей активностью с VEGFR-1 человека ( $k_m = 0.05$  и  $0.4$  мкМ соответственно), при этом мАТ 3В12 демонстрировало связывающую активность и с VEGFR-1 мыши ( $k_m = 2.0$  мкМ) (рис. 1).

*Экспрессия VEGF-A и VEGFR-1 в клеточных линиях карциномы молочной железы и рака кишечника.* Экспрессию VEGF-A и VEGFR-1 анализировали с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени на линиях клеток РМЖ – MCF-7, MDA-MB-231 и РК – Hutu-80, SW-480, LoVo человека, а также на линиях клеток РМЖ – EMT-6 и РК – СТ-26 мыши. VEGF-A экспрессировался на уровне мРНК во всех протестированных клеточных линиях человека и не детектировался в линиях клеток мыши (рис. 2). Транскрипты VEGFR-1 были обнаружены во всех клеточных линиях, за исключением клеток линии LoVo (рис. 2), что, возможно, объясняется наличием мутации или делеции в этих клетках в выбранной системе праймеров для ОТ-ПЦР. В целом полученные результаты показывают, что VEGFR-1 и его лиганд VEGF-A широко ко-экспрессируются в клеточных линиях карциномы молочной железы и рака кишечника.



**Рис. 1.** Иммуноферментный анализ моноклональных антител 3В12 и 4С1 к антигену-мишени VEGFR-1 человека (а) и мыши (б).

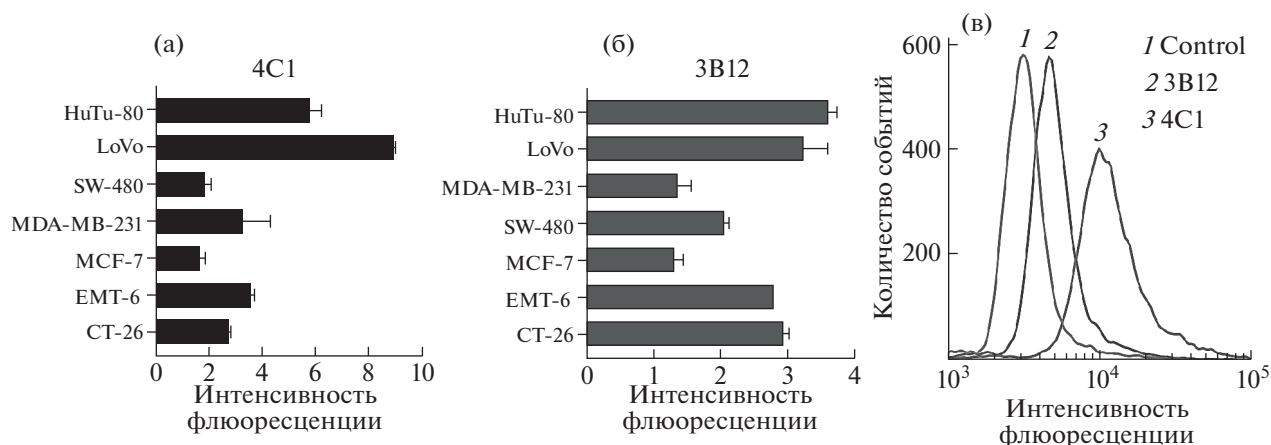


**Рис. 2.** Относительный уровень мРНК VEGFR-1 (а) и VEGF-A (б) в культурах клеток рака молочной железы (РМЖ) и рака кишечника (РК) человека и мыши. Данные ОТ-ПЦР представлены как среднее значение соотношения мРНК целевого гена/мРНК Actin ± SD.

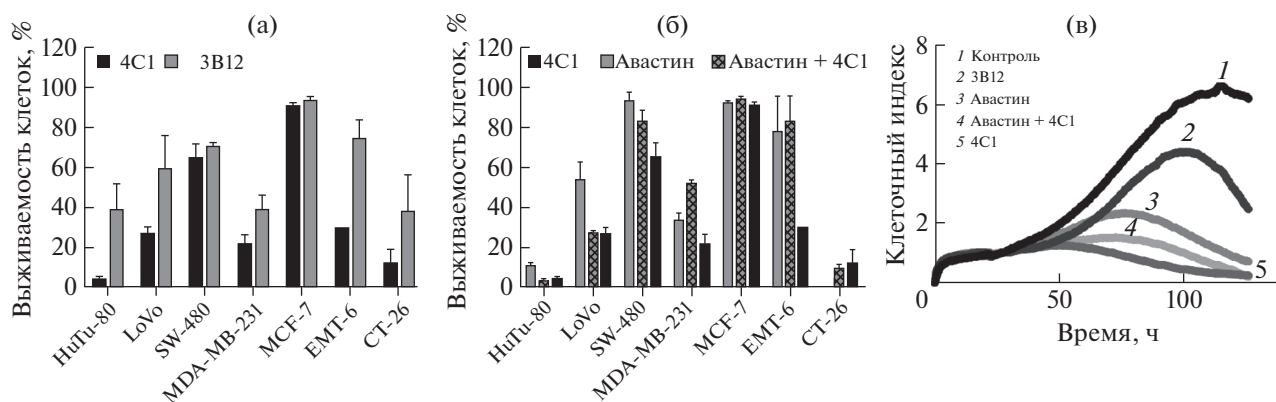
Все клеточные линии были положительными в отношении экспрессии на клеточной поверхности VEGFR-1, что было проверено с помощью проточной цитометрии (рис. 3). Экспрессия VEGFR-1 на поверхности клеток линии Hutu-80 показана на рис. 3в в качестве примера репрезентативного результата. Цитометрическую визуализацию рецептора осуществляли с помощью полученных МАТ к VEGFR-1 человека 4С1 и 3В12. Результаты демонстрируют более эффективное связывание МАТ клона 4С1 к эпитопу VEGFR-1 на поверхности клеток человека по сравнению с МАТ клона 3В12 (рис. 3). При этом эффективность связывания МАТ клона 3В12 к поверхностному эпитопу VEGFR-1 клеток мыши выше по сравнению с МАТ клона 4С1, что согласуется с данными ИФА, демонстрирующими перекрест-

ную аффинность МАТ 3В12 к рекомбинантному антигену VEGFR-1 мыши (рис. 16).

*МАТ к VEGFR-1 человека ингибируют пролиферацию клеток рака молочной железы и кишечника in vitro.* Чтобы оценить рост клеток РМЖ или РК при блокировании VEGFR-1 моноклональными антителами, пролиферация всех клеточных линий была проанализирована с использованием инструмента xCELLigence DP, позволяющего детектировать клеточный индекс в режиме реального времени. Использование антител 4С1 и 3В12 не значительно влияло на пролиферацию клеток линий MCF-7 и SW-480 и значительно подавляло рост клеток линий MDA-MB-231, EMC-6, Hutu-80, LoVo и CT-26 (рис. 4а), что, очевидно, связано со значительным наличием антигена VEGFR-1 на поверхности этих клеток (рис. 3а, 3б).



**Рис. 3.** Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии поверхностного VEGFR-1 клеточными линиями Hutu-80, LoVo, SW480, MDA-MB-231, MCF-7, EMT6-HER2 и CT-26. Данные проточной цитометрии при визуализации VEGFR-1 мАТ 4C1 (а) и 3B12 (б). Пример результатов проточной цитометрии для клеток линии Hutu-80 (в).



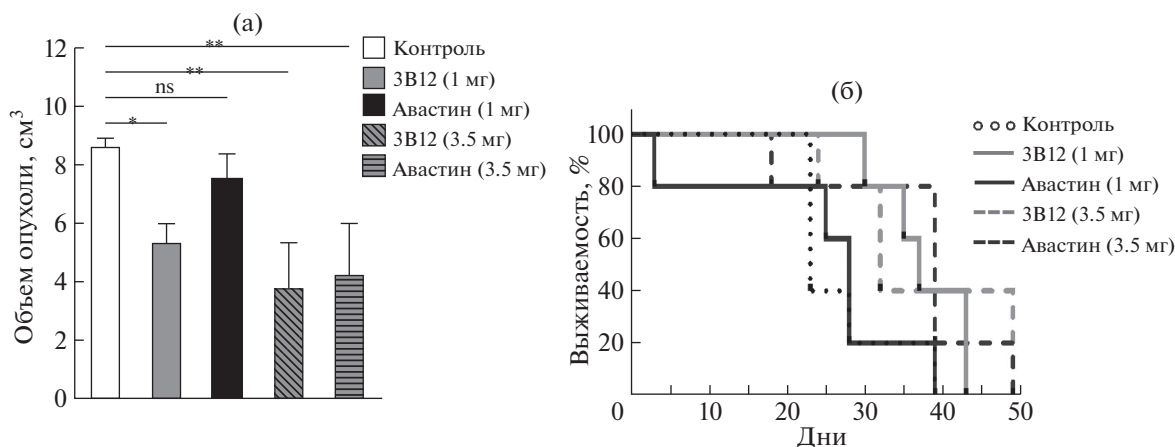
**Рис. 4.** Анализ пролиферативной активности клеток линий РМЖ и РК при инкубации в присутствии мАТ к VEGFR-1 человека 4C1 и 3B12 (а), препарата Авастин, связывающего VEGF-A, и их комбинации (б). Пример анализа пролиферации клеток линии Hutu-80 при соинкубации с: 1 – PBS (контроль), 2 – мАТ 3B12 (1 мг/мл), 3 – препаратом Авастин (1 мг/мл), 4 – комбинации Авастина (0.5 мг/мл) с мАТ 4C1 (0.5 мг/мл), 5 – мАТ 4C1 (1 мг/мл) (в).

На всех клеточных линиях была также протестирована иммунотерапевтическая схема лечения с использованием лекарственного препарата Авастин, представляющего собой гуманизированные антитела, связывающие VEGF-A, и комбинации мАТ 4C1 к рецептору VEGFR-1 с препаратом Авастин. Авастин не влиял на рост клеток SW-480, в которых уровень экспрессии как VEGFR-1, так и VEGF-A регистрировался как минимальный среди всех проанализированных линий; не значительно замедлял рост культуры MCF-7; значительно подавлял пролиферацию клеток линий Hutu-80, LoVo, MDA-MB-231 и CT-26 (рис. 4б). При инкубировании клеток в присутствии комбинации половинной дозы как препарата Авастин, так и мАТ 4C1 наблюдали синергетический эффект по сравнению с применением

Авастина в монорегиме для клеток линий Hutu-80, LoVo и CT-26 (рис. 4б, 4в).

*Ингибирование VEGFR-1 специфическим мАТ 3B12 подавляет in vivo рост карциномы кишечника мыши CT-26.* Чтобы оценить in vivo, предотвращает ли блокада VEGFR-1 рост опухолей кишечника, клетки линии CT-26 трансплантировали мышам породы DBA/BALB и через три дня после прививки опухоли проводили внутривенное введение: PBS (контроль), мАТ 3B12 (1 мг/мышь), мАТ 3B12 (3.5 мг/мышь), препарата Авастин (1 мг/мышь), препарата Авастин (3.5 мг/мышь). Системное введение мАТ 3B12 в дозе 1 мг/мышь и 3.5 мг/мышь каждые 3 дня приводило к статистически значимому ( $p < 0.05$ ) подавлению роста опухолевых трансплантатов CT-26 (рис. 5а).

Средняя продолжительность жизни после прививки опухолевых клеток составила: в группе



**Рис. 5.** Ингибирование VEGFR-1 моноклональными антителами замедляет рост опухолевого узла *in vivo* (а) и увеличивает продолжительность жизни животных с перевитыми опухолями СТ-26 (б).

контроля, не получавшей лечения, — 23 дня; в группах, получавших системное введение мАТ 3B12 в объеме 1 и 3.5 мг/мышь, — 37 и 32 дня соответственно, препарата Авастин в объеме 1 и 3.5 мг/мышь, — 28 и 39 дней соответственно (рис. 5б). При этом значимое ( $p < 0.5$ ) увеличение продолжительности жизни животных по сравнению с контролем детектировали для групп, получавших введение мАТ 3B12 (1 мг/мышь) или препарата Авастин (3.5 мг/мышь) (рис. 5б). Таким образом, полученные в данном исследовании мАТ 3B12 к рецептору VEGFR-1, а также мАТ, входящие в состав препарата Авастин и связывающие VEGF-A, уменьшают темп роста опухолевого узла *in vivo* и продлевают выживаемость мышей с перевитыми клетками карциномы кишечника СТ-26.

Участие VEGFR-1 в индукции ангиогенного переключения при патологических состояниях, мобилизации стволовых клеток-предшественников из костного мозга, а также в росте и миграции опухолей подтверждает гипотезу о терапевтической эффективности воздействия на этот рецептор [4, 8, 16, 18, 29]. Помимо активации в различных опухолях VEGFR-1 экспрессируется в моноцитах/макрофагах и участвует в их рекрутировании в опухолевые участки, где они секретируют проангиогенные факторы, которые дополнительно стимулируют рост опухоли и способствуют устойчивости к анти-VEGF-A-терапии [30]. Селективное ингибирование VEGFR-1 мАТ может усиливать эффекты антиангиогенной терапии VEGF-A и противодействовать развитию резистентности к этому виду препаратов [29]. Механизмы устойчивости опухоли к бевацизумабу включают в себя повышенную экспрессию VEGFR-1 (в опухолевых, эндотелиальных клетках и моноцитах/макрофагах) и передачу сигнала и/или активацию специфического лиганда VEGFR-1 — PIGF [1, 6]. Таким образом, снижение модуляции пути

PIGF/VEGFR-1 может задерживать или предотвращать резистентность к агентам против VEGF-A. Устойчивость к терапии анти-VEGF-A также может быть связана с образованием кровеносных сосудов с помощью механизмов, альтернативных ангиогенезу, например инвагинации, васкулогенной мимикрии [29].

В представленной работе описаны новые мАТ 4C1 и 3B12, распознающие VEGFR-1 и препятствующие его активации лигандами VEGF-A или PIGF. Полученные мАТ 4C1 и 3B12 направлены против пептида, аминокислотная последовательность которого включена во внеклеточный домен рецептора, что подтверждается данными проточной цитометрии, регистрирующей наличие нативного VEGFR-1 на поверхности ряда опухолевых линий. Полученные мАТ 4C1 и 3B12, вероятно, ингибируют клеточный ответ, который следует за связыванием лигандов VEGF-A и/или PIGF с рецептором, тем самым замедляя темп пролиферации ряда опухолевых клеток *in vitro*. Кроме того, мАТ 3B12 распознает VEGFR-1 как человека, так и мыши, что было показано с помощью ИФА. Таким образом, появилась возможность проанализировать влияние лечения мАТ 3B12 на опухолевый трансплантат. мАТ 3B12 оказывало противоположную опухолевую активность *in vivo*. Фактически эффективность пяти доз 3B12 по 180 мг/кг была сопоставима с эффективностью пяти доз бевацизумаба (препарат Авастин) в той же дозировке.

Несмотря на участие в опухолевом ангиогенезе, VEGFR-1 не играет значимой роли в физиологическом ангиогенезе у взрослых [16, 18]. Поэтому антиангиогенная терапия, избирательно воздействующая на этот рецептор, может демонстрировать более низкую системную токсичность по сравнению с терапией, нацеленной на VEGF-A и/или VEGFR-2 [18, 29]. Действительно, введение мАТ 3B12 в высокой концентрации 180 мг/кг на моде-

ли мышцы переносилось очень хорошо. Кроме того, в *in vitro*-экспериментах комбинированное воздействие мАТ 4С1 к рецептору VEGFR-1 и препарата Авастин, представляющего собой гуманизированные антитела, связывающие VEGF-A, демонстрировало синергетический эффект по сравнению с применением Авастина в монорежиме для клеток некоторых линий. На этом основании одновременное воздействие на VEGFR-1 с помощью мАТ и блокада VEGF-A, вероятно, приведут к повышению терапевтической эффективности, не вызывая аддитивной токсичности.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в исследовании новые моноклональные антитела имеют сродство к рецептору VEGFR-1 и эффективно ингибируют рост опухолевых клеток рака молочной железы или кишечника *in vitro* и *in vivo*.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 075-15-2021-1360) и в рамках государственного задания (регистрационный номер № 121060200125-2).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fischer C., Mazzone M., Jonckx B., Carmeliet P. // Nat. Rev. Cancer. 2008. V. 8. № 12. P. 942. <https://doi.org/10.1038/nrc2524>
2. Roskoski R.Jr. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. V. 75. № 3. P. 287. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.121>
3. Lohela M., Bry M., Tammela T., Alitalo K. // Cur. Opin. Cell. Biol. 2009. V. 21. № 2. P. 154 <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.12.012>
4. Al Kawas H., Saaid I., Jank P. et al. // Cell. Oncol (Dordr). 2022. V. 45. № 2. P. 227. <https://doi.org/10.1007/s13402-022-00665-w>
5. Schwartz J.D., Rowinsky E.K., Youssoufian H. et al. // Cancer. 2010. V. 116. № 4 Suppl. P. 1027. <https://doi.org/10.1002/cncr.24789>
6. Adini A., Kornaga T., Firoozbakht F., Benjamin L.E. // Cancer Res. 2002. V. 62. № 10. P. 2749.
7. Zhou Y., Bellingard V., Feng K.T. et al. // Dev. Biol. 2003. V. 263. № 1. P. 114. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00449-4](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00449-4)
8. Ceci C., Atzori M.G., Lacal P.M., Graziani G. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 4. P. 1388. <https://doi.org/10.3390/ijms21041388>
9. Wu Y., Hooper A.T., Zhong Z. et al. // Int. J. Cancer. 2006. V. 119. № 7. P. 1519. <https://doi.org/10.1002/ijc.21865>
10. Wu Y., Zhong Z., Huber J. et al. // Clin. Cancer Res. 2006. V. 12. № 21. P. 6573. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0831>
11. Levati L., Ruffini F., Muzi A. et al. // Int. J. Oncol. 2011. V. 38. № 1. P. 241.
12. Marasco L.E., Kornblihtt A.R. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2023. V. 24. № 4. P. 242. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00545-z>
13. Kendall R.L., Thomas K.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. № 22. P. 10705. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10705>
14. Kendall R.L., Wang G., Thomas K.A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. V. 226. № 2. P. 324. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1355>
15. Orecchia A., Lacal P.M., Schietroma C. et al. // J. Cell. Sci. 2003. V. 116. № 17. P. 3479. <https://doi.org/10.1242/jcs.00673>
16. Melincovici C.S., Boşca A.B., Şuşman S. et al. // Rom. J. Morphol. Embryol. 2018. V. 59. № 2. P. 455.
17. Shah A.A., Kamal M.A., Akhtar S. // Cur. Drug. Metab. 2021. V. 22. № 1. P. 50. <https://doi.org/10.2174/1389200221666201019143252>
18. Mabeta P., Steenkamp V. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 24. P. 15585. <https://doi.org/10.3390/ijms232415585>
19. Dakowicz D., Zajkowska M., Mroczko B. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 6. P. 3375. <https://doi.org/10.3390/ijms23063375>
20. Bible K.C., Ryder M. // Nat. Rev. Clin. Oncol. 2016. V. 13. № 7. P. 403. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.19>
21. Falcon B.L., Chintharlapalli S., Uhlik M.T., Pytowski B. // Pharmacol. Ther. 2016. V. 164. P. 204. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.06.001>
22. Crona D.J., Keisler M.D., Walko C.M. // Ann. Pharmacother. 2013. V. 47. № 12. P. 1685. <https://doi.org/10.1177/1060028013509792>
23. Higa G.M., Abraham J. // Expert Rev. Anticancer Ther. 2009. V. 9. № 7. P. 999. <https://doi.org/10.1586/era.09.68>
24. Chen H.X., Cleck J.N. // Nat. Rev. Clin. Oncol. 2009. V. 6. № 8. P. 465. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.94>
25. Autiero M., Lutun A., Tjwa M., Carmeliet P. // J. Thromb. Haemost. 2003. V. 1. № 7. P. 1356. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00263.x>
26. Fragoso R., Pereira T., Wu Y. et al. // Blood. 2006. V. 107. № 8. P. 3057. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2530>
27. Zhou Z., Zhao C., Wang L. et al. // Am. J. Cancer Res. 2015. V. 5. № 10. P. 3149.
28. Sidman R.L., Li J., Lawrence M. et al. // Sci. Transl. Med. 2015. V. 7. № 309. P. 309ra165. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac4882>
29. Saravanan S., Vimalraj S., Pavani K. et al. // Life Sci. 2020. V. 252. P. 117670. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117670>
30. Kerber M., Reiss Y., Wickersheim A. et al. // Cancer Res. 2008. V. 68. № 18. P. 7342. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6241>