

Доронин Игорь Игоревич

**Противоопухолевые эффекты модифицированных фрагментов
GD2-специфичных антител**

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва — 2015

Работа выполнена в группе липидных модуляторов иммунитета отдела иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук,

Холоденко Роман Васильевич

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор,

Сащенко Лидия Павловна

Заведующий лабораторией молекулярной иммуногенетики рака Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН).

Кандидат биологических наук,

Лупатов Алексей Юрьевич

Ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии отдела персонализированной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ).

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

Защита состоится « 24 » июня 2015 года в 10:00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, г. Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН) и на сайте ИБХ РАН: www.ibch.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2015 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

В России ежегодно диагностируется около 500 тыс. новых случаев онкологических заболеваний, а число умерших от злокачественных новообразований составляет более 280 тыс. человек в год. Эти цифры во многом обусловлены как проблемами ранней диагностики, так и несовершенством существующих методов противоопухолевой терапии. В связи с этим, в настоящее время во всем мире остро стоят задачи по разработке новых адресных, высокоэффективных и низкотоксичных методов терапии онкологических заболеваний. Одним из таких наиболее перспективных направлений является иммунотерапия с использованием препаратов на основе моноклональных антител, направленных на таргетные опухолевые молекулы.

Мишенями для иммунотерапии рака могут служить не только белки, но и гликофинголипиды, в частности ганглиозиды. Среди данных молекул наиболее ярко выделяется ганглиозид GD2, гиперэкспрессируемый опухолями различного происхождения, включая нейробластомы, ретинобластомы, меланомы, мелкоклеточный рак легких, остеосаркомы, рабдомиосаркомы, саркомы Юинга. По некоторым данным GD2-позитивные опухоли составляют около 10% от общего числа онкологических заболеваний, и для многих из них характерна крайне ограниченная эффективность классических методов терапии.

Применение антител к GD2 дало существенный эффект, выраженный в супрессии опухолевых клеток в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo*. Несколько препаратов GD2-специфичных моноклональных антител (мАт) в настоящее время проходят клинические испытания, которые свидетельствуют в пользу перспективности иммунотерапии в лечении GD2-позитивных опухолей. Однако выявлены побочные эффекты, вызванные иммуногенностью препаратов и гиперактивацией иммунной системы, что во многом опосредуется Fc-фрагментом моноклональных антител. Кроме того, большинство GD2-позитивных новообразований представляют собой солидные опухоли, для которых характерна невысокая противоопухолевая эффективность моноклональных антител, обусловленная большими размерами молекул.

В последнее время появились данные о прямой индукции гибели опухолевых клеток под действием GD2-специфичных антител. При этом цитотоксическая активность моноклональных антител не опосредована классическими иммунными механизмами элиминирования опухолевых клеток, для проведения которых необходим Fc-фрагмент антител. В связи с этим открывается новый подход к исследованию GD2-связывающих фрагментов антител в качестве индукторов гибели опухолевых клеток. В настоящее время в мировой литературе нет данных по изучению цитотоксических и противоопухолевых

эффектов фрагментов GD2-специфичных антител. Таким образом, получение и модификация фрагментов GD2-специфичных антител, изучение их способности к индукции гибели опухолевых клеток и исследование их противоопухолевых эффектов, является актуальной задачей и первым шагом к получению нового перспективного инструмента для адресной терапии GD2-позитивных опухолей.

Цель работы — изучить цитотоксические и противоопухолевые эффекты фрагментов GD2-специфичных антител.

Задачи исследования:

- 1) Доказать, что индукция клеточной гибели под действием GD2-специфичных антител является общим свойством GD2-позитивных опухолевых линий.
- 2) Получить гибридомы, продуцирующие GD2-специфичные антитела.
- 3) Выделить различные GD2-связывающие фрагменты антител.
- 4) Изучить эффекты полученных GD2-связывающих фрагментов антител на GD2-позитивные опухолевые клетки.
- 5) Сравнить цитотоксические эффекты и механизмы клеточной гибели, индуцированные фрагментами GD2-специфичных антител и полноразмерными антителами.
- 6) Провести химические модификации фрагментов GD2-специфичных антител.
- 7) Изучить противоопухолевые эффекты модифицированных фрагментов GD2-специфичных антител в мышинной модели рака.

Научная новизна

В настоящей работе проведен системный анализ цитотоксических эффектов GD2-специфичных антител, а также их производных на различных опухолевых клеточных линиях *in vitro* и в мышинной модели *in vivo*. Впервые показана прямая индукция клеточной гибели GD2-позитивных опухолевых клеток под действием фрагментов моноклональных антител. Произведена оценка вклада различных механизмов клеточной гибели в процессы, запускаемые под действием производных GD2-специфичных антител по сравнению с полноразмерными антителами. Была получена линия клеток гибридомы, секретирующей GD2-специфичные антитела; для решения этой задачи был применен подход иммунизации лабораторных животных при помощи KLH-модифицированных ганглиозид-мимикрирующих пептидов. Сконструированы оригинальные рекомбинантные scFv-фрагменты, способные связывать опухолеассоциированный ганглиозид GD2. Впервые для фрагментов GD2-специфичных антител показано, что увеличение времени циркуляции за счет монопегилирования Fab-фрагментов в мышинной модели ведет к существенному усилению противоопухолевых эффектов по сравнению с немодифицированными аналогами.

Научно-практическая значимость работы

Полученные данные открывают широкие практические перспективы использования фрагментов GD2-специфичных антител в качестве нового, предположительно низкотоксичного инструмента противоопухолевой терапии. Кроме того, полученные GD2-специфичные антитела могут стать основой для разработки высокочувствительных методов диагностики GD2-позитивных онкологических заболеваний, а также эффективных иммунотерапевтических препаратов химерных / гуманизированных GD2-специфичных моноклональных антител.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Свойство GD2-специфических антител и их фрагментов индуцировать клеточную гибель, является общей особенностью GD2-позитивных опухолевых клеток.
2. С использованием оригинального подхода по применению KLN-модифицированных GD2-мимикрирующих пептидов получена линия клеток гибридомы, секретирующих GD2-специфичные моноклональные антитела, не проявляющие кросс-реактивности с другими ганглиозидами.
3. Созданные scFv-фрагменты антител 3F8, обладающие способностью связывать ганглиозид GD2, являются оптимальной модульной молекулой для изучения функциональных свойств данного опухолевого маркера.
4. Сайт-направленное пегилирование Fab-фрагментов GD2-специфичных моноклональных антител не влияет на связывающую способность, а также цитотоксические свойства фрагментов антител, а противоопухолевая активность модифицированных фрагментов возрастает за счет увеличения времени их циркуляции в организме.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 159 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов, заключения, списка сокращений, а также списка литературы, включающего 199 источников. Диссертация содержит 53 рисунка и 7 таблиц.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием в работе комплекса методических подходов: современных высокочувствительных молекулярно-биологических, биохимических и иммунологических методов исследования, тщательным

учетом и подробной оценкой результатов с использованием адекватных методов статистической обработки данных.

Основные результаты диссертации были доложены на конференции «15th International Congress of Immunology - ICI 2013», 2013, Милан, Италия; XXIII, XXIV, XXV, XXVI Зимних молодёжных научных школах «ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ», 2011-2014, Москва, Россия; научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии "X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова", 2011, Москва, Россия; научной конференции «Programmed Cell Death in Biology and Medicine», 2012, Moscow, Russia; XVIII, XX Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011, 2013»: Секция «Биология», Москва, Россия.

Публикации

По материалам работы опубликовано 6 статей в рецензируемых научных журналах, а также 13 публикаций в материалах научных конференций.

Основное содержание работы

1.1 Выбор клеточной модели для исследования действия GD2-специфичных антител и их фрагментов

Для выбора оптимальной клеточной модели была проанализирована экспрессия ганглиозида GD2 на клетках более чем 20 опухолевых клеточных линий различного происхождения. Основываясь на полученных данных, было выбрано три клеточные линии, отличающиеся самым высоким уровнем экспрессии ганглиозида GD2: клетки мышинной лимфомы EL-4, клетки нейробластомы человека IMR-32 и клетки меланомы человека mS; а также три линии, которые характеризуются либо полным отсутствием, либо крайне низким уровнем экспрессии GD2: клетки лимфомы человека Jurkat, мышинной нейробластомы Neuro-2A, а также меланомы человека A375. Поверхностное окрашивание данных клеток AlexaFluor488-мечеными GD2-специфичными моноклональными антителами 14G2a и последующий их анализ методом проточной цитофлуориметрии показал, что линии опухолевых клеток EL-4, IMR-32 и mS являются GD2-позитивными и характеризуются высоким и равномерным уровнем экспрессии поверхностного ганглиозида GD2 (Рис. 1 А), в то же время клетки линий Jurkat, Neuro-2A и A375 не экспрессируют на своей поверхности GD2 или экспрессируют его в минимальном количестве (Рис. 1 Б), и их можно считать GD2-негативными линиями.

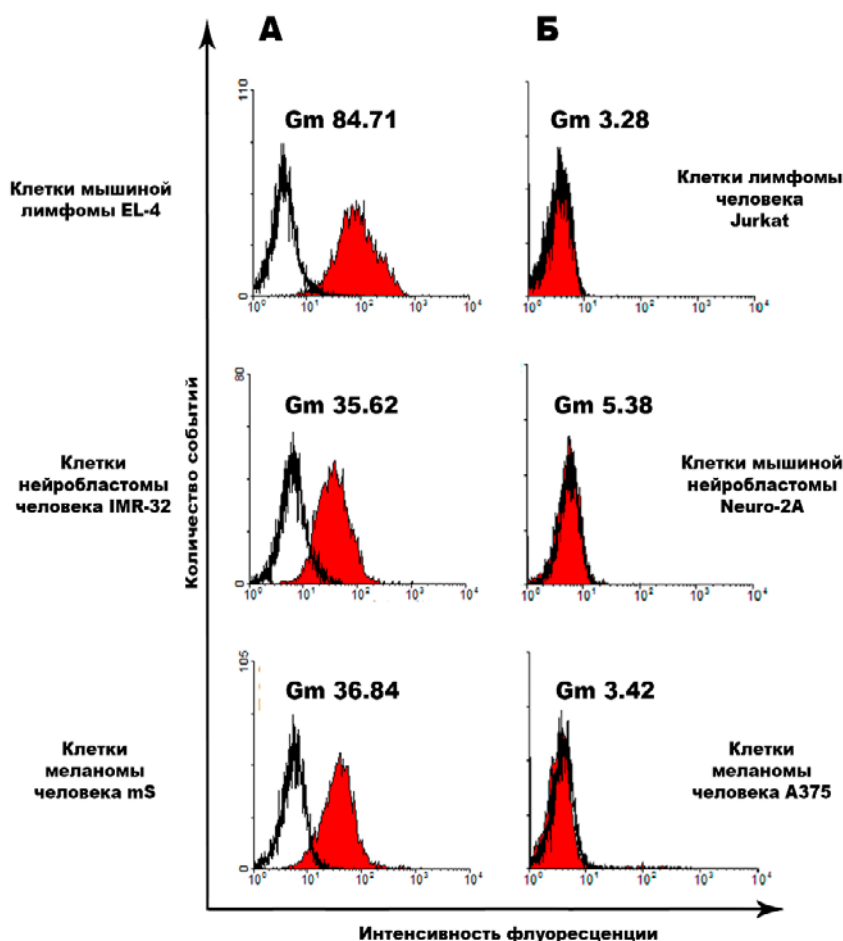


Рисунок 1. Цитометрические измерения клеток, окрашенных мАт 14G2a-AlexaFluor488 (5 мкг/мл). Пики, обозначенные цветом, отражают флуоресценцию клеток, окрашенных GD2-мАт, контур – пик контрольных клеток, окрашенных анти-изотипическими антителами. Представлены результаты репрезентативного эксперимента.

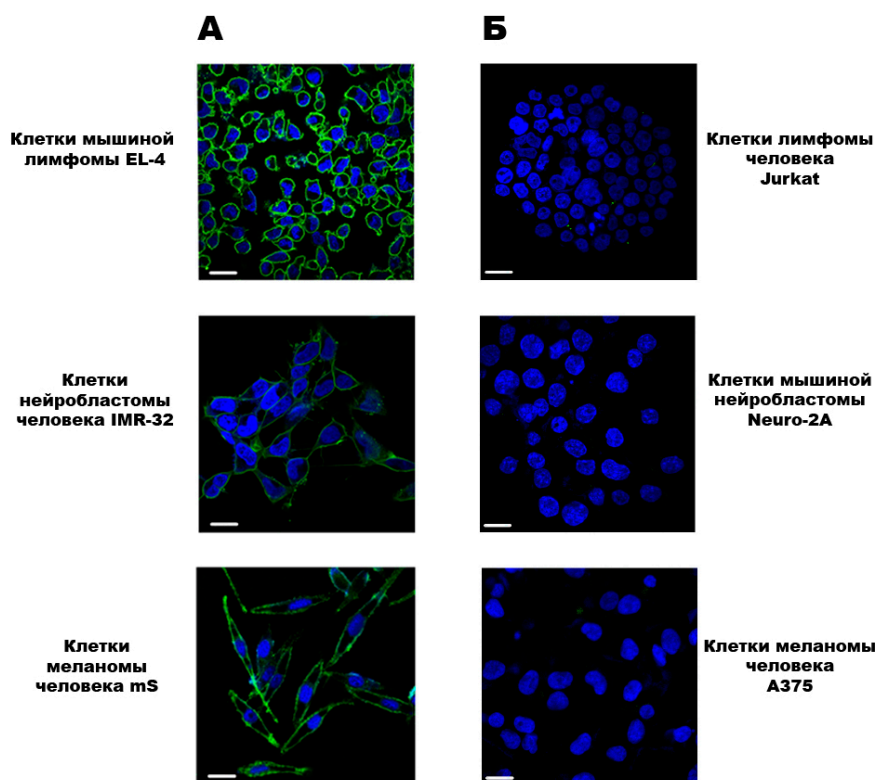


Рисунок 2. Экспрессия ганглиозида GD2 клетками линий EL-4, IMR-32, mS, Jurkat, Neuro-2a, и A375. Данные конфокальной микроскопии. Окрашивание клеток мАт14G2a-AlexaFluor488. Зеленым обозначена флуоресценция AlexaFluor488-меченых мАт 14G2a. Ядра докрашены Hoechst 33342 (синий цвет). Отрезок шкалы – 50 мкм.

Результаты проточной цитофлуориметрии были подтверждены иммуноцитохимическим окрашиванием клеток анти-GD2-мАт с их последующей визуализацией с помощью конфокальной микроскопии (Рис. 2). Таким образом, двумя методами была проанализирована экспрессия ганглиозида GD2 на поверхности клеток нескольких клеточных линий. GD2-позитивные клеточные линии EL-4, mS и IMR-32 характеризуются высокой экспрессией ганглиозида GD2, при этом самый высокий уровень экспрессии наблюдается на клетках мышинной лимфомы EL-4. Результаты представленных экспериментов позволили выбрать адекватную клеточную модель для изучения эффектов GD2-специфичных антител и их фрагментов в последующих экспериментах.

1.2 Цитотоксические эффекты GD2-специфичных антител на опухолевые клеточные линии

Перед оценкой цитотоксических эффектов анти-GD2-мАт на выбранные клеточные линии был проведен анализ их чистоты. Выделение анти-GD2-мАт ME361 из асцитной жидкости мышей, получивших инъекцию клеток гибридомы HB9326, происходило в две стадии – сначала аффинная хроматография на Protein A-колонке, затем при помощи ионообменной HPLC на катионной колонке TSKgel SP-5PW. По результатам ПААГ-электрофореза (Рис. 3 А) чистота полученного белка после HPLC составляла более 95%.

Для того чтобы проанализировать влияние GD2-специфичных антител на опухолевые клетки, был проведен ряд классических функциональных тестов. Было обнаружено, что

после 24-часовой инкубации опухолевых клеток с анти-GD2-мАт, GD2-позитивные клетки линий EL-4, IMR-32 и mS претерпевали значительные морфологические изменения, включая сильное гранулирование и округление клеток с уменьшением их размера, наблюдалось открепление адгезионных клеток от подложки, а также формирование клеточных агрегатов.

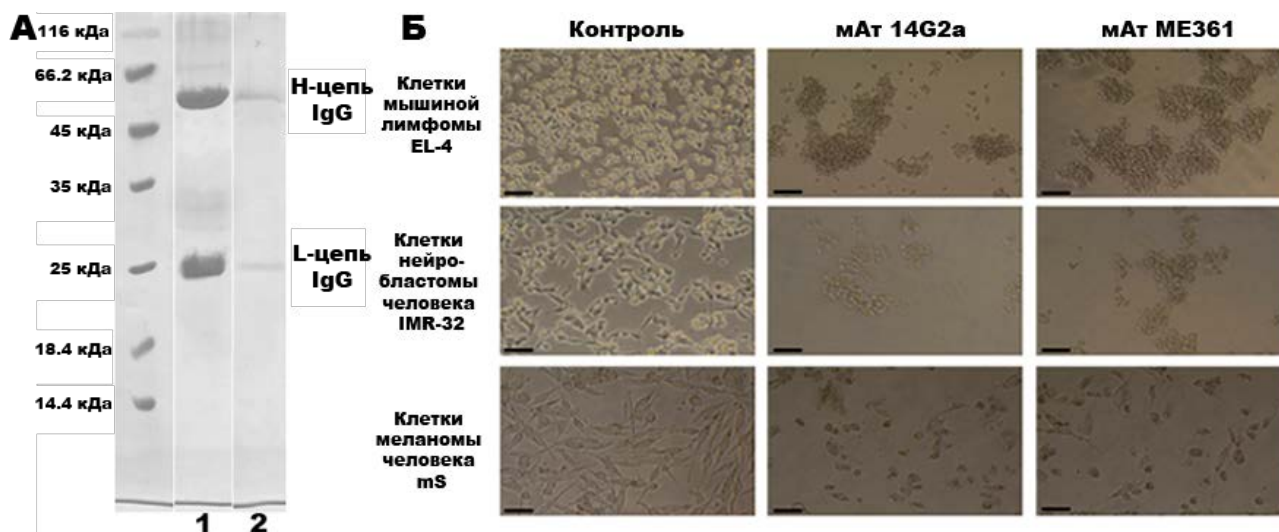


Рисунок 3. А) Электрофорез в ПААГ (12,5%) мАт ME361. 1) мАт ME361 после очистки на Pt A-колонке. 2) мАт ME361 после очистки на Pt A-колонке + HPLC. Б) Морфологические изменения GD2-позитивных клеточных линий EL-4, IMR-32 и mS через 24 ч. инкубации с GD2-специфичными антителами (500 тыс. клеток /образец, 14G2a и ME361, 5 мкг/мл); Контроль – клетки в полной среде без антител. Отрезок шкалы - 50 мкм.

Указанные морфологические изменения были наиболее ярко выражены для клеточных линий EL-4 и mS (Рис. 3 Б). При этом использованные анти-GD2-мАт 14G2a и ME361 не влияли на морфологию GD2-негативных клеточных линий Jurkat, Neuro-2A и A375.

Также был исследован уровень фрагментации ДНК в опухолевых клетках после инкубации с анти-GD2-мАт. Для этого клетки окрашивали ДНК-связывающим агентом – пропидум иодидом (PI). На гистограммах распределения интенсивности флуоресценции PI можно выделить пик с высокой интенсивностью флуоресценции, соответствующий живым клеткам, и пик с низкой интенсивностью флуоресценции, соответствующий клеткам с фрагментированной ДНК. Процент клеток под гиподиплоидным пиком для трех протестированных GD2-позитивных опухолевых клеточных линий EL-4, mS и IMR-32 увеличивался после инкубации с анти-GD2-мАт по сравнению с интактными клетками.

После 24-х часов инкубации с двумя различными типами анти-GD2-мАт 14G2a и ME361 в концентрации 5 мкг/мл процент клеток EL-4 с фрагментированной ДНК увеличивался в 5.0 ± 0.7 и 3.1 ± 0.9 раз по сравнению с базовым уровнем соответственно (Рис. 4). По сравнению с клетками линии EL-4, увеличение процента клеток с фрагментированной ДНК для клеток IMR-32 и mS было несколько ниже, но также статистически значимо.

Количество клеток IMR-32 с фрагментированной ДНК после инкубации с антителами увеличивалось в 2.5 ± 0.5 и 1.7 ± 0.7 раз для 14G2a и ME361 соответственно.

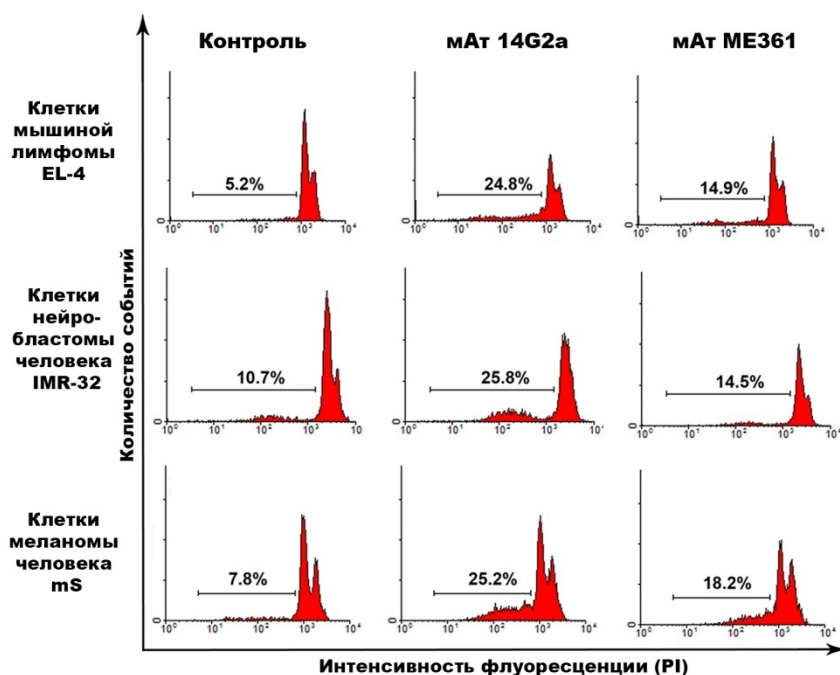


Рисунок 4. PI-тест. Анализ уровня фрагментации ДНК клеток GD2-положительных клеточных линий после инкубации (24 ч) с GD2-специфичными антителами (500 тыс. клеток /образец, 5 мкг/мл). Здесь и далее маркером обозначена доля клеток с фрагментированной ДНК.

Для клеток линии mS, обработанных антителами 14G2a и ME361, эти значения составляли 3.2 ± 0.4 и 2.3 ± 0.5 соответственно (Рис. 4). Важно отметить, что антитела 14G2a и ME361 не увеличивали число клеток с фрагментированной ДНК после их инкубации с клетками линий Jurkat, Neuro-2A и A375.

При помощи МТТ-теста была исследована жизнеспособность опухолевых клеток в присутствии различных концентраций GD2-специфичных моноклональных антител. GD2-специфичные антитела значительно снижали жизнеспособность GD2-положительных клеточных линий EL-4, mS и IMR-32, практически не оказывая влияния на GD2-негативные клеточные линии Neuro-2A, A375 и Jurkat (Рис. 5). Следует отметить, что антитела 14G2a проявили более сильные цитотоксические эффекты на GD2-положительных клеточных линиях по сравнению с антителами ME361.

После 72-часовой инкубации клеток с наибольшей из использованных концентраций антител 14G2a (10 мкг/мл), самый сильный эффект наблюдался на клетках лимфомы EL-4, которые характеризуются гиперэкспрессией ганглиозида GD2. Жизнеспособность клеток EL-4 снизилась более чем на 80%, а жизнеспособность клеток mS и IMR-32 – на 60-70% (Рис. 5).

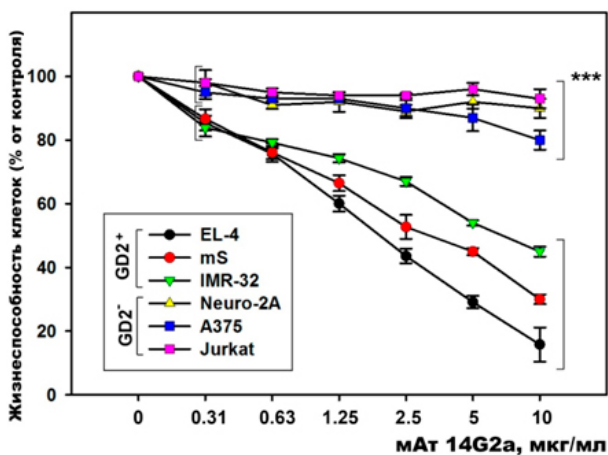


Рисунок 5. МТТ-тест. Сравнение влияния различных концентраций мАт 14G2a на жизнеспособность опухолевых клеток. Инкубация в течение 72 ч. Каждая точка — среднее значение жизнеспособности клеток, полученное в трех независимых экспериментах, в каждом из экспериментов было проведено три повтора каждой точки. (***, $P < 0.001$, Student-Newman-Keuls post-hoc анализ).

Уровни жизнеспособности GD2-положительных и GD2-негативных клеток статистически достоверно различались для концентраций антител ME361 выше 2.5 мкг/мл. Для клеточных линий EL-4 и mS самая высокая из использованных концентраций антител ME361 (10 мкг/мл) снижала выживаемость клеток на 60% и 40% соответственно.

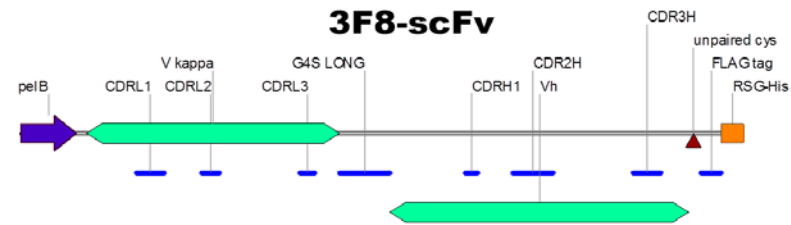
Таким образом, было доказано, что GD2-специфичные антитела 14G2a и ME361, использованные в работе, представляют чистые белковые фракции. Были выявлены сильные цитотоксические эффекты антител на клетки, несущие ганглиозид GD2, причем гибель клеток под действием анти-GD2-мАт напрямую коррелировала с уровнем экспрессии данного маркера. Эффекта от воздействия высоких концентраций различных GD2-специфичных антител на GD2-негативные опухолевые клеточные линии не обнаруживалось.

2.1 Создание и экспрессия рекомбинантного scFv-фрагмента GD2-специфичного антитела 3F8

На следующем этапе работы стояла задача создать рекомбинантные scFv-фрагменты на основе GD2-специфичных моноклональных антител 3F8, а также проверить их способность связывать опухолеассоциированный ганглиозид GD2. Использование GD2-связывающих фрагментов антител в формате scFv представляется наиболее перспективным для изучения цитотоксических эффектов фрагментов GD2-специфичных антител.

Для конструирования scFv-фрагмента были выбраны GD2-специфичные антитела 3F8. Выбор именно этого антитела был обусловлен его высокой аффинностью к GD2 ($KD = 5$ нМ), отсутствием кросс-реактивности с другими ганглиозидами, а также наличием в научной литературе нуклеотидной и аминокислотной последовательностей. Конструкция представляет собой фрагменты антител 3F8 (VL и VH), содержащие лидерный пептид, а также два тэга – FLAG и His6, которые позволяют эффективно очищать рекомбинантные белки с использованием Ni-NTA-агарозы (Рис. 6).

Рисунок 6. Структура разработанного scFv-фрагмента.



Для наработки scFv-фрагментов был выбран штамм HMS174(DE3)pLysS, поскольку он характеризовался максимальной экспрессией целевого белка. Выделенные тотальные фракции белка индуцированных и не индуцированных клеток HMS174(DE3)pLysS, а также фракция периплазматических белков индуцированных клеток HMS174(DE3)pLysS были проанализированы при помощи ПААГ-электрофореза. Из анализа представленной электрофореграммы видно, что в лизате индуцированных клеток присутствует дополнительная полоса белка с молекулярной массой порядка 28 кДа (Рис. 7 Б2), который, скорее всего, является искомым scFv-фрагментом моноклонального антитела 3F8, поскольку ожидаемая масса сконструированного фрагмента после отрезания лидерного пептида составляет ~ 28 кДа. К сожалению, его периплазматическая экспрессия оказалась слишком низкой (Рис. 7 Б3). Вероятно, большая часть целевого белка оказалась в тельцах включения, что может быть связано с не оптимальными подобранными условиями культивирования клеток. В связи с этим стояла задача выделения scFv-фрагментов из телец включения и подбор условий рефолдинга scFv-фрагментов.

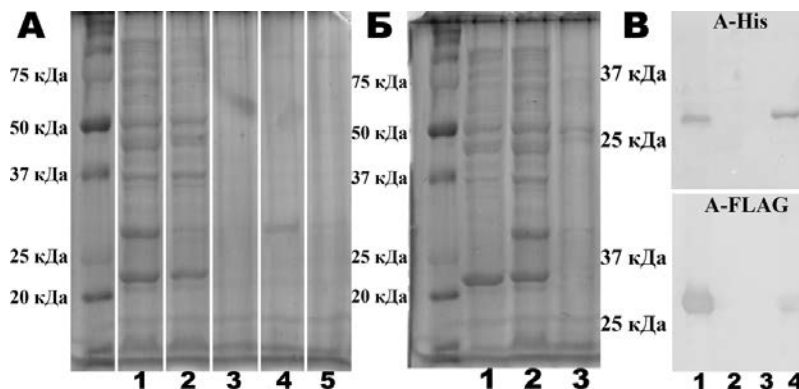


Рисунок 7. А) Аффинная очистка scFv-фрагментов антител с использованием Ni-NTA агарозы, 12,5% ПААГ-электрофорез. 1) Тотальная фракция белка индуцированных клеток, выделенная в денатурирующих условиях. 2) Элюция 100 mM NaH₂PO₄. 3) Элюция 10 mM Tris-HCl. 4) Элюция 8 М мочевиной (pH 5.9). 5). Элюция 8 М мочевиной (pH 4.5). Б) Электрофорез в ПААГ (12,5%) лизатов HMS174(DE3)pLysS в восстанавливающих условиях. 1) Тотальная фракция белка не индуцированных клеток, выделенная в денатурирующих условиях. 2) Тотальная фракция белка индуцированных клеток, выделенная в денатурирующих условиях. 3) Периплазматическая фракция белка индуцированных клеток. В) Вестерн-блот. 1) клеточный лизат индуцированной культуры, 2) клеточный лизат не индуцированной культуры, 3) бычий сывороточный альбумин, 4) очищенные с использованием Ni-NTA scFv-фрагменты. Инкубация 2 ч. Вторичные антитела anti-His

1:1000 (24 ч), anti-rabbit HRP 1:500 (1 ч), anti-FLAG 1:2000 (24 ч), anti-mouse HRP 1:12000 (1 ч). Визуализация с использованием Metal Enhanced DAB Substrate Kit.

Так как экспрессируемый scFv-фрагмент содержал гистидиновую метку, то его последующая очистка из лизата осуществлялась при помощи Ni-NTA агарозы. Оценку чистоты полученных scFv-фрагментов проводили методом ПААГ-электрофореза (Рис. 7 А). Как видно из Рисунка 7 АЗ, именно белок из денатурированного лизата индуцированных клеток с массой около 28 кДа связывается с Ni-NTA, что подтверждает предположение о том, что он является сконструированным scFv-фрагментом. Суммарный выход scFv-фрагмента в данных условиях составляет ~ 10% от общего белка. Для дополнительной характеристики выделенного белка был проведен вестерн-блот анализ с использованием His- и FLAG-специфичных антител (Рис. 7В). Как можно видеть из рисунка, His- и FLAG-специфичные антитела эффективно связываются с белком в районе 28 кДа во фракциях индуцированных клеток, а также фракциях, очищенных на Ni-NTA. Связывания антител с фракцией не индуцированных клеток не наблюдалось (Рис. 7 В2).

Для восстановления пространственной структуры был проведен рефолдинг с использованием цистамин хлорида / дигидрохлорида. Выход реакции составлял не более 1%, тем не менее, полученного количества белка хватило для оценки его связывания с ганглиозидом GD2.

2.2 Изучение связывающей способности полученных scFv-фрагментов

Связывающую способность scFv-фрагментов моноклональных антител проверяли методами иммуноферментного анализа (Рис. 8 А) и проточной цитофлуориметрии на различных GD2-позитивных клетках (Рис. 8 Б).

Полученные рекомбинантные GD2-связывающие scFv-фрагменты, сконструированные на основе моноклональных антител 3F8, способны взаимодействовать с опухолеассоциированным ганглиозидом GD2.

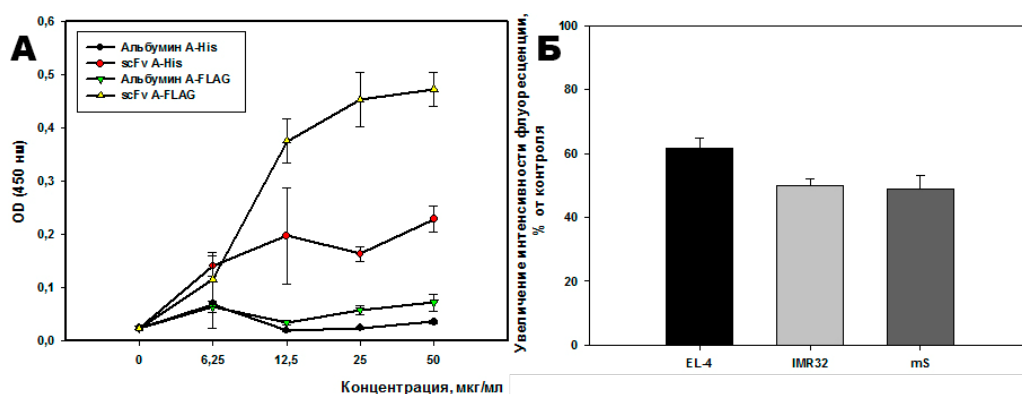


Рисунок 8. А) Прямой ИФА. Окрашивание антителами anti-His или anti-FLAG, с последующим окрашиванием антивидовыми HRP-мечеными антителами. На подложке

сорбированный ганглиозид GD2 (250 нг/лунка). Здесь и далее каждая точка в трёх повторах. Б) Результаты поверхностного окрашивания клеток EL-4. Представлено отношение интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных GD2-специфичными scFv-фрагментами антител 3F8 к интенсивности флуоресценции контрольных клеток.

3.1 Создание гибридомы, продуцирующей специфичные моноклональные антитела к опухолеассоциированному ганглиозиду GD2

Главной задачей следующего этапа работы являлось получение стабильных гибридом, производящих моноклональные антитела к ганглиозиду GD2. Необходимость этого заключается в отсутствии доступных гибридом, продуцирующих строго специфичные антитела к GD2. Для реализации поставленной задачи был использован адаптированный метод классической гибридомной технологии. В качестве иммуногена были выбраны ганглиозид-мимикрирующие пептиды, полученные с использованием GD2-специфичных антител 14G2a, наиболее схожие по своей пространственной структуре с углеводными детерминантами ганглиозида GD2, а также их гемоцианин (KLH)-модифицированные аналоги. Оценка продукции GD2-специфичных антител после иммунизации GD2-мимикрирующими пептидами, а также их KLH-модифицированными аналогами производилась при помощи ИФА (Рис. 9 А).

Модификация ганглиозид-мимикрирующих пептидов при помощи KLH позволила в несколько раз усилить иммунный ответ с образованием GD2-специфичных антител по сравнению с не модифицированными пептидами (Рис. 9А). После процедуры получения гибридом отбор клонов производился методом последовательных лимитирующих разведений. Исходя из сравнения аффинности полученных антител, продуцированных различными клонами, при помощи ИФА, была выбрана наиболее оптимальная по ряду характеристик гибридома, продуцирующая антитела, обозначенные 9P-L1.

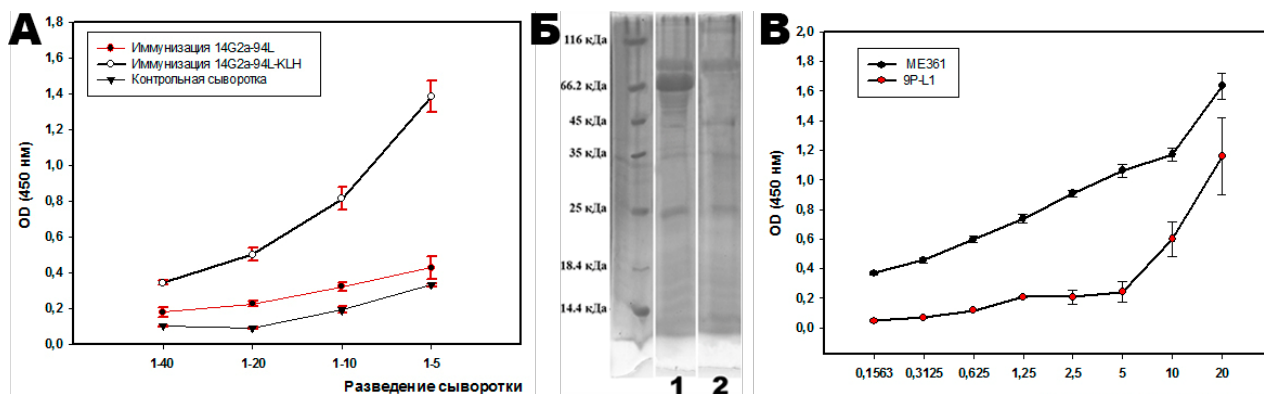


Рисунок 9. А) Прямой ИФА, на подложке ганглиозид GD2 (250 нг/лунка). Сыворотки получены после четырехкратной иммунизации пептидами 14G2a-94L и 14G2a-94L-KLH в полном адьюванте Фрейнда. Контроль – сыворотка, полученная от интактной мыши. Вторичные антитела anti-mouse-HRP 1:6000. Б) ПААГ-электрофорез (10%) антител 9P-L1 в

восстанавливающих условиях: **1).** Фракция антител 9P-L1 после очистки на Protein A колонке. **2).** Фракция антител 9P-L1 после последующей очистки на HPLC. В) Прямой ИФА. Различные концентрации антител 9P-L1 и ME361 вторичные антитела anti-mouse-HRP (fab-specific) 1:6000. На подложке ганглиозид GD2 (250 нг/лунка).

Изотипирование полученных антител показало, что они относятся к IgM классу иммуноглобулинов. Антитела 9P-L1 проявили способность связываться с Protein A, однако для получения чистой фракции антител потребовалась дополнительная хроматографическая очистка, позволившая получить фракции антител 9P-L1 с чистотой порядка 80%, что было показано при помощи ПААГ-электрофореза (Рис. 9 Б). Полученные антитела 9P-L1 обладают хорошей GD2-связывающей способностью при сравнении с моноклональными антителами ME361, что было показано в ходе прямого ИФА с ганглиозидом GD2 (Рис. 9 В).

Также полученные антитела способны эффективно связываться с мембранным ганглиозидом GD2 клеток EL-4 (Рис. 10А). После 24-х часов инкубации клеток мышинной лимфомы EL-4 с антителами 9P-L1 в концентрации 20 мкг/мл процент клеток с фрагментированной ДНК увеличивался в 1.9 ± 0.4 по сравнению с базовым уровнем (Рис. 10А2), что подтверждает общую закономерность, заключающуюся в индукции гибели GD2-позитивных опухолевых клеток под действием различных GD2-специфичных антител.

Проанализирована кросс-реактивность 9P-L1 с другими ганглиозидами (Рис. 10 Б). Антитела ME361 проявляют кросс-реактивность к ганглиозиду GD3, который является очень близким к ганглиозиду GD2 по структуре, но при этом его экспрессия отмечается на клетках нормальных тканей и органов, что существенно ограничивает возможности использования полноразмерных антител этого типа. Для антител 14G2a и 9P-L1 параметры кросс-реактивности для всех исследованных ганглиозидов не превышали 5%.

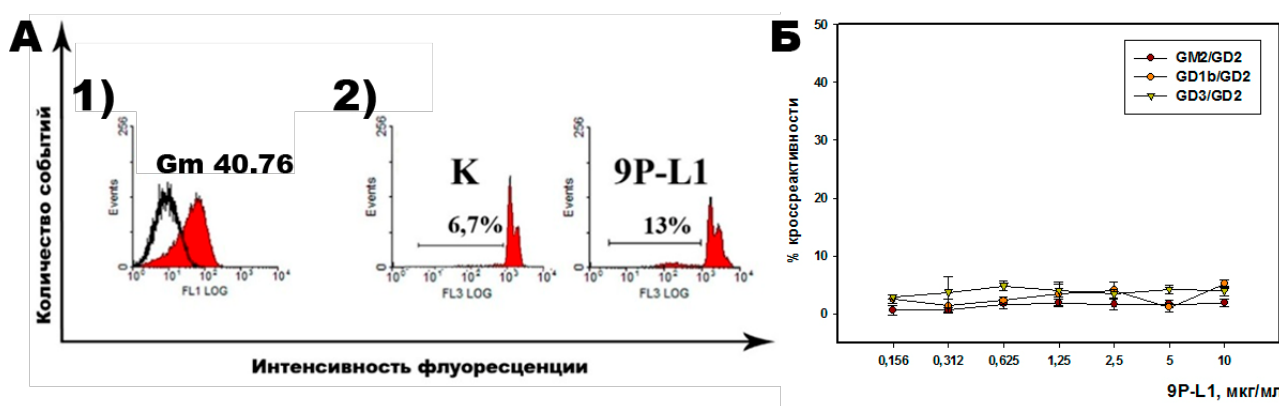


Рисунок 10. А. 1). Цитометрические измерения клеток EL-4, окрашенных GD2-специфичными антителами 9P-L1, вторые антитела anti-mouse Fab-specific-FITC (титр 1:2000). 2). PI-тест. Анализ уровня фрагментации ДНК клеток GD2-позитивной клеточной линии EL-4 после инкубации (24 ч) с GD2-специфичными антителами 9P-L1 (500 тыс. клеток / образец, 20 мкг/мл). Б. Оценка кросс-реактивности GD2-специфичных антител 9P-L1 с ганглиозидами GM2, GD1b и GD3 по результатам ИФА. Антивидовые HRP-меченые анти-

Fab-специфичные антитела (1:6000). На подложке 250 нг/лунка различных ганглиозидов. % кросс-реактивности рассчитывался по отношению OD раствора пероксидазной реакции после связывания антител с ганглиозидами GM2, GD1b или GD3 к OD раствора после связывания антител с ганглиозидом GD2.

Для подтверждения результатов об отсутствии кросс-реактивности антител 9P-L1 с другими ганглиозидами было проведено цитометрическое окрашивание клеток различными GD2-специфичными антителами. Результаты поверхностного окрашивания этих линий представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Результаты поверхностного окрашивания различных линий опухолевых клеток GD2-специфичными антителами (5 мкг/мл).

Клеточная линия	Фенотип	Эффективность окрашивания антителами			
		14G2a	ME361	9P-L1	R24
EL-4	GD2 ⁺ GD3 ⁻	высокая	высокая	высокая	-
mS	GD2 ⁺ GD3 ⁺	средняя	средняя	средняя	средняя
SKOV-3	GD2 ⁻ GD3 ⁺	-	низкая	-	средняя
Jurkat	GD2 ⁻ GD3 ⁻	-	-	-	-

Данные, представленные в Таблице 1 демонстрируют связывание полученных антител 9P-L1 с двумя GD2-позитивными линиями EL-4 и mS, а также полностью подтверждают результаты об отсутствии кросс-реактивности антител 9P-L1 с ганглиозидом GD3, поскольку они не показали связывания с GD3-позитивными клетками линии SKOV-3. GD2-специфичные антитела 14G2a, взятые, как контроль строго специфичных к ганглиозиду GD2 антител, также не связались с клетками этой линии. В случае антител ME361, для которых характерна кросс-реактивность к ганглиозиду GD3, было зарегистрировано изменение интенсивности флуоресценции GD3-позитивной линии SKOV-3. Анти-GD3-мAb R24 окрасили клетки линий mS и SKOV-3. Все использованные в эксперименте антитела не связывались с поверхностью GD2- и GD3-негативных клеток линии Jurkat.

3.2 Энзиматическое получение фрагментов GD2-специфичных моноклональных антител класса IgM

Фрагменты антител 9P-L1 были получены протеолизом при помощи гидролазы пепсина, иммобилизованного на агарозе. Данный фермент специфически разрушает молекулу IgM между C_μ1-, C_μ2- и C_μ3-доменами. При обработке IgM пепсином можно получить несколько типов фрагментов антител — F(ab)² фрагменты (до 150 кДа), Fab-фрагменты (до 50 кДа) и Fv-фрагменты (порядка 25 кДа). Для очистки полученных фрагментов была использована Protein A колонка, что было обусловлено свойством антител 9P-L1 связываться с этим носителем, в результате чего были получены GD2-связывающие фрагменты этих антител.

Поверхностное окрашивание клеток мышинной лимфомы линии EL-4 с использованием полученных GD2-специфичных фрагментов антител демонстрирует увеличение уровня средней интенсивности флуоресценции клеток по сравнению с контрольными клетками (Рис. 11 А). Полученные фрагменты способны достоверно индуцировать гибель опухолевых клеток, количество клеток с фрагментированной ДНК увеличилось практически в два раза по сравнению с контрольными клетками (Рис. 11 Б), при этом следует отметить, что по сравнению с полноразмерными антителами 9P-L1 эффекты снизились незначительно.

Энзиматическое получение GD2-связывающих фрагментов антител 9P-L1 и изучение их цитотоксической активности позволило решить одну из основных задач работы – доказать сохранение способности к индукции гибели клеток фрагментами GD2-специфичных антител. В то же время ферментативное получение фрагментов из антител IgM не является оптимальным способом наработки их достаточных количеств и требует разработки весьма трудоёмких методов очистки смеси данных фрагментов. По этой причине в дальнейшей работе были использованы фрагменты антител ME361 (IgG), для которых методики получения и очистки индивидуальных фрагментов являются однозначными и относительно простыми.

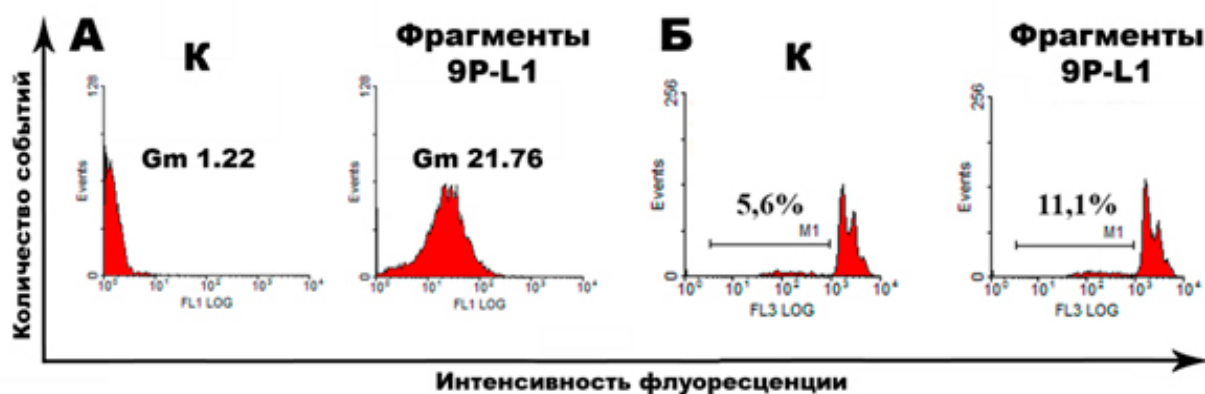


Рисунок 11. А) Цитометрические измерения клеток мышинной лимфомы EL-4, окрашенных GD2-специфичными фрагментами антител 9P-L1 (10 мкг/мл), вторые антитела anti-mouse Fab-specific-FITC (Титр 1:2000). Б) Цитотоксические эффекты фрагментов GD2-специфичных антител 9P-L1, регистрируемые PI-тестом. Анализ уровня фрагментации ДНК клеток GD2-позитивной клеточной линии EL-4 после инкубации (24 ч) с GD2-связывающими фрагментами антител (500 тыс. клеток / образец, 10 мкг/мл).

4.1 Энзиматическое получение Fab-фрагментов GD2-специфичных антител ME361

Чистые Fab-фрагменты антител ME361 были получены методом протеолиза с использованием иммобилизованного на агарозе фермента папаина (Рис. 12 А). Поверхностное окрашивание клеток GD2-позитивных линий EL-4 и mS показало связывание

полученных Fab-фрагментов антител ME361 с мембранным GD2 (Рис. 12 Б). Для клеток линии мышинной лимфомы EL-4 отношение уровней средней интенсивности флуоресценции ME361 к Fab ME361 составляло 2.13 ± 0.1 , а для клеток линии меланомы человека mS – 2 ± 0.1 . Вероятно, сниженная интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных Fab-фрагментами антител ME361, объясняется моновалентным взаимодействием Fab-фрагментов с антигеном.

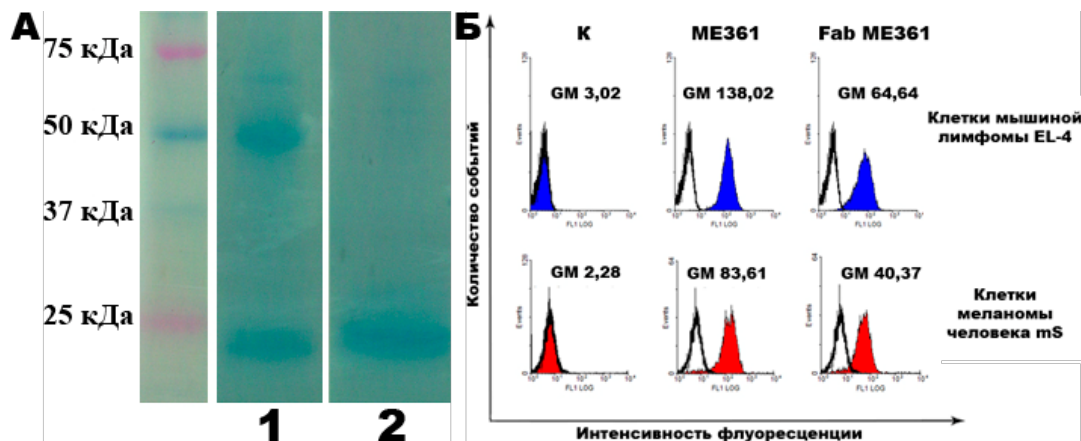


Рисунок 12. А) ПААГ-электрофорез (10%) GD2-специфичных антител и их фрагментов в восстанавливающих условиях. 1 – Антитела ME361; 2 – Fab-фрагменты антител ME361. Б) Гистограммы окрашивания клеток GD2-позитивных опухолевых линий EL-4 и mS антителами ME361 и Fab ME361 в концентрации 50 нМ.

Связывание полученных Fab-фрагментов с ганглиозидом GD2 также было проанализировано с использованием дот-блота и ИФА. Минимальное количество ганглиозида, детектируемое в случае использования Fab-фрагментов составило 80 нг, тогда как при использовании полноразмерных антител ME361 удалось детектировать 20 нг антигена, нанесенного на нитроцеллюлозную мембрану.

4.2 Сравнение цитотоксических эффектов Fab-фрагментов антител ME361 с полноразмерными антителами

Сравнительная оценка цитотоксических эффектов, индуцируемых полученными Fab-фрагментами анти-GD2-мAb ME361 и полноразмерными антителами, проводилась методами проточной цитофлуориметрии и с использованием МТТ-теста.

Fab-фрагменты и полноразмерные антитела ME361 значительно снижают жизнеспособность клеток GD2-позитивной линии EL-4. Так, для антител ME361 характерно более выраженное снижение выживаемости клеток при низких концентрациях с последующим выходом на плато, в то время как Fab-фрагменты антител индуцировали более плавное ингибирование жизнеспособности клеток. Для Fab-фрагментов выхода на плато не наблюдается и происходит равномерное дозозависимое снижение жизнеспособности клеток EL-4 (Рис. 13 А).

Влияние фрагментов и полноразмерных антител ME361 на клетки мышинной лимфомы EL-4 оценивали по нескольким параметрам:

Нарушение целостности плазматической мембраны с использованием флуоресцентного зонда 7-AAD — через 4 ч инкубации клеток линии EL-4 с мАт ME361 количество 7-AAD-позитивных клеток существенно повышалось по сравнению с контрольными клетками. После индукции клеток Fab-фрагментами изменений не наблюдалось. После суточной инкубации клеток EL-4 с индукторами происходило значимое увеличение количества 7-AAD-позитивных клеток как в образцах с антителами ME361, так и с Fab-фрагментами этих антител, что говорит об увеличении проницаемости мембран клеток при действии антител и их Fab-фрагментов. Полноразмерные антитела индуцируют нарушение целостности плазматической мембраны на ранних временах инкубации с клетками, в то время как для фрагментов этот процесс оказывается отсроченным (Рис. 13 Б).

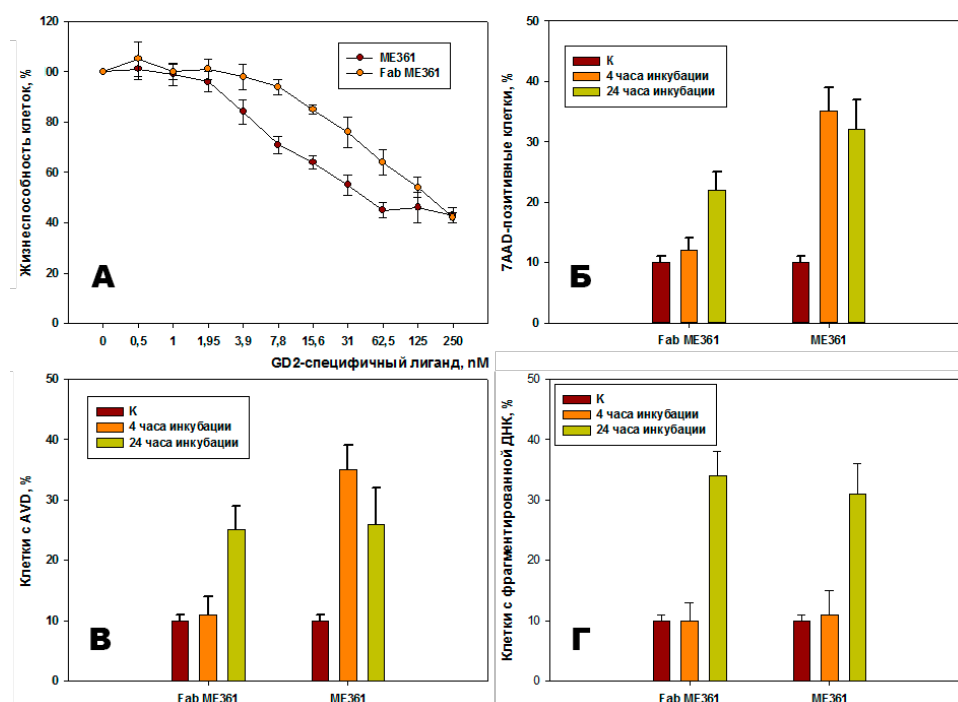


Рисунок 13. А) МТТ-тест клеток EL-4. Клетки (10 тыс/лунка, инкубация с ME361 и Fab ME361 3 дня). Б) Результаты 7AAD-окрашивания клеток EL-4 после инкубации с анти-GD2 мАт ME361 и их Fab-фрагментами (50 нМ). В) Результаты цитометрического измерения AVD клеток EL-4, обработанных анти-GD2 мАт ME361 и их Fab-фрагментами (50 нМ). Г) Результаты PI-теста клеток EL-4, проинкубированных с анти-GD2 мАт ME361 и их Fab-фрагментами (50 нМ).

При апоптоз-индуцированном уменьшении объема (AVD) происходит уменьшение размера клеток с увеличением их гранулированности. При воздействии анти-GD2-мАт ME361 на клетки мышинной лимфомы EL-4 происходит увеличение количества клеток с AVD уже через 4 ч после инкубации. Этот показатель возрастал через 24 ч инкубации клеток с антителами. Кратковременная (4 ч) инкубация клеток с Fab-фрагментами не приводила к

достоверно значимому изменению уровня AVD. Существенное увеличение числа клеток с AVD происходило только после 24 ч инкубации с фрагментами антител (Рис. 13 В).

Результаты PI-теста показали, что инкубация клеток EL-4 в течение 4 ч как с антителами ME361, так и с их Fab-фрагментами не приводила к увеличению доли клеток с фрагментированной ДНК, в то время как после 24 ч инкубации количество клеток с фрагментированной ДНК увеличивалось в 3.4 и 3.1 раза для Fab-фрагментов и антител ME361 соответственно (Рис. 13 Г).

Результаты вышеописанных экспериментов показывают, что Fab-фрагменты антител ME361 сохраняют цитотоксические эффекты, характерные для полноразмерных антител. В то же время некоторые этапы клеточной гибели, индуцированные антителами и их фрагментами, различаются. Инкубация клеток с полноразмерными антителами приводит к более быстрой индукции нарушения целостности плазматической мембраны и уменьшения клеточного объема, чем инкубация с Fab-фрагментами.

Одним из методических подходов, позволяющих дифференцировать гибель клеток на ранний апоптоз и некроз, является FITC-Annexin-V тест.

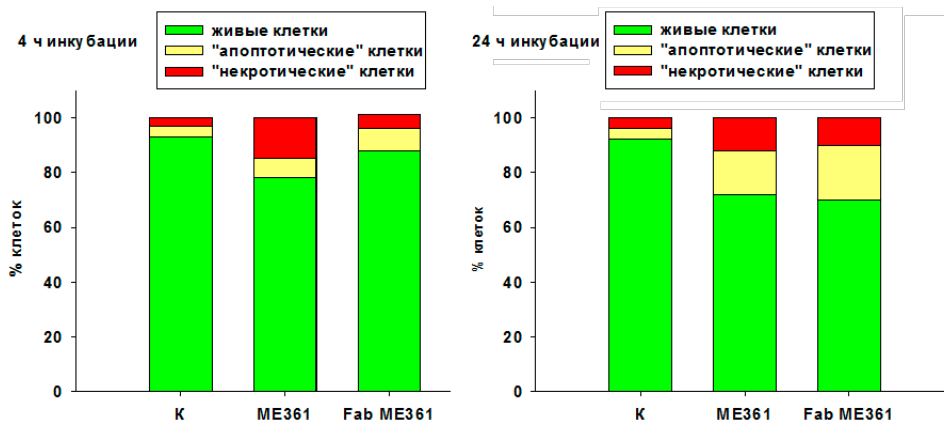


Рисунок 14. FITC-Аннексин V тест. Распределение живых, апоптотических и некротических клеток в популяциях контрольных и индуцированных в течение 4-х и 24-х часов анти-GD2-мАт ME361 и их фрагментами клеток линии EL-4 (50 нМ).

Короткая инкубация клеток с антителами и их Fab-фрагментами приводила лишь к незначительному увеличению доли апоптотических клеток (позитивных по FITC-Annexin V и негативных по PI), в то время как количество “некротических” клеток (позитивных по FITC-Annexin V и PI) возрастало почти в 5 раз в случае инкубации клеток с антителами ME361. Возрастания количества позитивных по FITC-Annexin V и PI клеток после короткой инкубации с Fab-фрагментами не наблюдалось. После 24-х часовой инкубации картина изменялась – после воздействия антител и их Fab-фрагментов значительно возростала доля апоптотических клеток относительно контрольных клеток – в 4 и в 5 раз, соответственно. Так же увеличивалась доля позитивных по FITC-Annexin V и PI клеток, которые находятся либо в некрозе, либо на поздних стадиях апоптоза.

Ингибитор каспаз снизил долю клеток с фрагментированной ДНК, индуцированную антителами ME361, лишь на 20%. В случае клеточной гибели, запущенной Fab-фрагментами ME361, ингибирующая активность Z-VAD-FMK была значительно выше и составляла почти 50%. Исходя из представленных результатов можно предположить, что клеточная гибель, индуцированная анти-GD2-мАт ME361 проходит по сложному пути, имеющему признаки как апоптоза, так и некроза, а клеточная гибель, активированная их Fab-фрагментами, в большей степени проходит по апоптотическому пути.

4.3 Пегилирование Fab-фрагментов ME361

Известно, что Fab-фрагменты моноклональных антител значительно менее стабильны в организме за счёт отсутствия Fc-фрагмента, и время их циркуляции существенно ниже, чем для полноразмерных моноклональных антител. Поэтому перед исследованием противоопухолевых эффектов фрагментов антител *in vivo*, представлялось необходимым провести их химическую модификацию с целью улучшения фармакокинетических характеристик. В качестве наиболее оптимальной модификации фрагментов антител было выбрано монопегилирование Fab-фрагментов.

На электрофореграмме отчетливо видны полосы, соответствующие полноразмерным Fab-фрагментам (Рис. 15 А1), монопегилированным Fab-фрагментам 5 кДа (~55 кДа) и 10 кДа (~60 кДа) (Рис. 15 А2 и 15 А3).

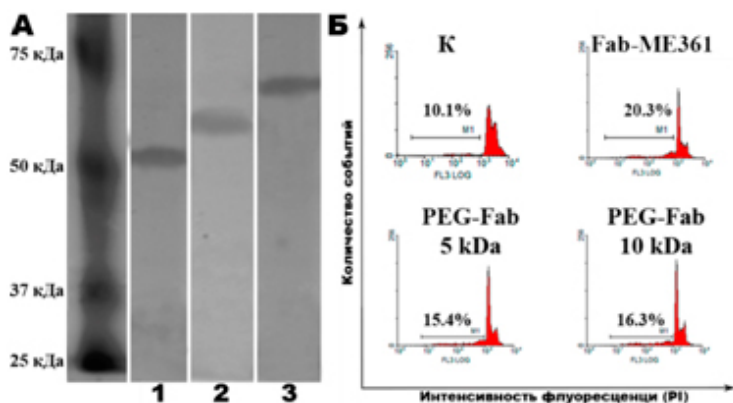


Рисунок 15. А) ПААГ-электрофорез (12.5%) фрагментов антител ME361 в невосстанавливающих условиях. Б) PI-тест. Анализ уровня фрагментации ДНК GD2-позитивной клеточной линии EL-4 после суточной инкубации (500 тыс. клеток /образец, 5 мкг/мл).

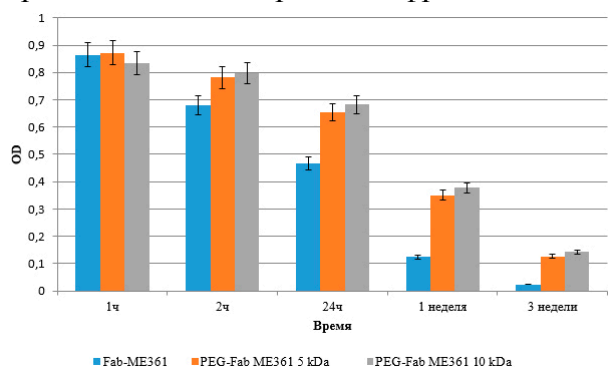
Для оценки сохранения специфичности и цитотоксической активности полученных пегилированных Fab-фрагментов были использованы методы проточной цитометрии и иммуноферментного анализа. Fab-фрагменты GD2-специфичных моноклональных антител сохранили способность связывать ганглиозид GD2 после конъюгирования с полиэтилен гликолем как в случае 5 кДа, так и 10 кДа. При этом не наблюдалось сильной потери аффинности по сравнению с неконъюгированными Fab-фрагментами. Помимо этого, как контрольные GD2-специфические антитела ME361, так и полученные фрагменты антител, а

также пегилированные Fab-фрагменты 5 и 10 кДа, показали связывание с клетками мышинной лимфомы EL-4.

Как видно из Рисунка 15 Б, после суточной инкубации с Fab-фрагментами и их пегилированными аналогами, количество клеток с фрагментированной ДНК возросло в 1,5-2 раза по сравнению с контролем. Таким образом, монопегилированные Fab-фрагменты антител ME361 сохраняют способность не модифицированных Fab-фрагментов связывать опухолеассоциированный ганглиозид GD2 и индуцировать гибель GD2-позитивных опухолевых клеток.

5.1 Изучение противоопухолевых эффектов Fab-фрагментов GD2-специфичных антител, а также их модифицированных аналогов *in vivo*

Для сравнения динамики используемых противоопухолевых агентов, с целью оценить, привело ли пегилирование фрагментов антител к увеличению времени их циркуляции в



крови, был исследован титр Fab-фрагментов и их пегилированных аналогов в сыворотке мышей линии C57Bl/6 на протяжении трех недель. Животным внутривенно вводили Fab-фрагменты или их пегилированные аналоги (200 мкг/мышь), затем на разных временных

Рисунок 16. Сравнение времени циркуляции фрагментов антител в организме мышей C57Bl/6.

интервалах проводился забор крови (100 мкл) и методом ИФА определялось присутствие GD2-связывающих фрагментов.

Пегилирование Fab-фрагментов GD2-специфических моноклональных антител ME361 позволило значительно увеличить время их циркуляции *in vivo* (Рис. 16).

Для того чтобы оценить противоопухолевую активность GD2-специфичных антител и их Fab-фрагментов была создана сингенная мышинная модель рака. Для этого мышам линии C57Bl/6 в хвостовую вену вводили клетки Т-лимфомы EL-4. Известно, что при таком способе введения клеток лимфомы EL-4 метастазы в основном образуются в печени.

Таблица 2. Дизайн эксперимента.

Номер группы	Количество животных в группе	Описание группы
1	5	Здоровые животные
2	5	Животные с опухолью без терапии
3	5	Однократная доза ME361 (200 мкг/мышь)
4	5	Однократная доза Fab GD2-мАт (200 мкг/мышь)
5	5	Однократная доза монопегилированных Fab-фрагментов

		(200 мкг/мышь)
6	5	Двукратная доза Fab GD2-мАт (200 мкг/мышь)

После вскрытия мышей группы 2 (животные с опухолью без терапии) через 30 дней после прививания опухолевых клеток было обнаружено обширное метастазирование, проявляющееся в поражении большинства органов. Наиболее выраженные метастазы были обнаружены в печени и почках исследуемых животных, при этом у 3 из 5 животных метастазами была поражена только одна почка, тогда как у 2 оставшихся животных метастазы содержали обе почки в равной степени. Метастазы в почках также обнаруживались в группах 4, 5 и 6. Однако степень развития и метастазирования опухоли у этих животных существенно отличалась от животных из группы 2. Так у животных из групп 5 и 6, которым внутривенно вводили пегилированные Fab-фрагменты антител и немодифицированные Fab-фрагменты двукратно через 7 и 14 дней, соответственно, после прививания опухолевых клеток развитие неоплазии было выражено слабее. При этом в обеих группах незначительные метастазы наблюдались только в почках, но не в печени.

При сравнении групп 4, 5 и 6 следует отметить тот факт, что Fab-фрагменты и их аналоги оказывают существенный противоопухолевый эффект. Причем наименьший эффект показала однократная доза немодифицированных Fab-фрагментов, с выраженными метастазами и в печени, и в почках, что обусловлено коротким временем полужизни молекул. Тогда как двукратная доза немодифицированных Fab-фрагментов и однократная доза пегилированных Fab-фрагментов проявили схожие высокие уровни противоопухолевой активности, что подтверждается отсутствием метастаз в печени и наличием незначительного метастазирования в почках. Таким образом, пегилирование Fab-фрагментов моноклональных антител ME361 действительно способно усилить положительный противоопухолевый эффект в системе *in vivo*. Вероятно, это связано в первую очередь с увеличенным временем циркуляции в организме.

Выводы

- 1) Индукция клеточной гибели GD2-специфичными антителами является общим и специфичным свойством, характерным для GD2-позитивных опухолевых линий.
- 2) Получена линия клеток гибридомы, продуцирующая GD2-специфичные антитела, характеризующиеся отсутствием кросс-реактивности с другими ганглиозидами.
- 3) Получены различные GD2-связывающие фрагменты на основе нескольких типов GD2-специфичных антител. Созданы scFv-фрагменты антител 3F8, фрагменты антител 9P-L1, и Fab-фрагменты антител ME361.
- 4) GD2-связывающие фрагменты антител 9P-L1 и Fab-фрагменты антител ME361 индуцируют гибель GD2-позитивных опухолевых клеток, сохраняя цитотоксические эффекты полноразмерных антител.
- 5) Механизмы клеточной гибели, индуцированной анти-GD2-мАт и их фрагментами, различаются. Полноразмерные антитела запускают гибель клеток, имеющую признаки некроза и апоптоза, в то время как для GD2-связывающих фрагментов преобладающей является гибель клеток путем апоптоза.
- 6) В результате сайт-направленного пегилирования Fab-фрагментов анти-GD2-мАт получены модифицированные производные, сохранившие способность связывать ганглиозид GD2 и индуцировать гибель GD2-позитивных опухолевых клеток.
- 7) Фрагменты GD2-специфичных антител обладают значимыми противоопухолевыми эффектами в мышинной сингенной модели рака. Сайт-направленное пегилирование фрагментов антител приводит к усилению противоопухолевых эффектов за счет увеличения времени циркуляции в организме.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. Холоденко И.В., **Доронин И.И.**, Холоденко Р.В. Клинические испытания антител к ганглиозиду GD2 для терапии онкологических заболеваний: перспективы и ограничения. *Современные проблемы венерологии, иммунологии и врачебной косметологии*. 2010. №6 (13). С. 79-83.
2. **Доронин И.И.**, Холоденко И.В., Молотковская И.М., Холоденко Р.В. Получение Fab-фрагментов GD2-специфичных антител и анализ их противоопухолевой активности in vitro. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012. Т. 154, №11. С. 616-622.
3. Холоденко И.В., **Доронин И.И.**, Вишнякова П.А., Болховитина Е.Л., Холоденко Р.В. Противоопухолевая активность GD2-специфичных антител и их Fab-фрагментов в мышинной модели рака. *Иммунология*. 2013. Т.34, № 4. С. 199-203.

4. Холоденко И.В., **Доронин И.И.**, Холоденко Р.В. Опухолевые модели в изучении онкологических заболеваний. *Иммунология*. 2013. Т.34, №5. С. 282-286.
5. **Igor I. Doronin**, Polina A. Vishnyakova, Irina V. Kholodenko, Eugene D. Ponomarev, Dmitry Y. Ryazantsev, Irina M. Molotkovskaya, Roman V. Kholodenko. Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells. *BMC Cancer*. 2014. 14 (1): 295.
6. Вишнякова П.А., **Доронин И.И.**, Холоденко И.В., Рязанцев Д.Ю., Молотковская И.М., Холоденко Р.В. Участие каспаз в клеточной гибели, индуцированной GD2-специфичными антителами. *Биоорганическая химия*. 2014. Т. 40, № 3. С. 305-314.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Доронин И.И.**, Холоденко И.В., Успенский Ю.А., Романова Н.А., Сухорукова Р.Х., Молотковская И.М., Холоденко Р.В. Выделение, очистка, модификация и проверка апоптоз-индуцирующей активности моноклональных антител к опухолевому ганглиозиду GD2. Научная конференция по биоорганической химии и биотехнологии "X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова", тезисы докладов и стендовых сообщений. 2011. С. 93.
2. **Доронин И.И.** Изучение апоптоз-индуцирующей активности моноклональных антител к опухолевому ганглиозиду GD2. Ломоносов 2011: XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: Секция «Биология», тезисы докладов. 2011. С. 48-49.
3. **Doronin I.I.**, Vishnyakova P.A., Kholodenko I.V, Molotkovskaya I.M., Kholodenko R.V. GD2-specific peptides - new approach for cancer diagnostics and therapy. Programmed cell death in biology and medicine, abstract book. 2012. p. 16-17.
4. Vishnyakova P.A., Kholodenko I.V, **Doronin I.I.**, Molotkovskaya I.M., Kholodenko R.V. Influence of GD2 specific antibody on cell-cycle and cyclins expression in murine T-cell lymphoma cell line. Programmed cell death in biology and medicine, abstract book. 2012. p. 64-65.
5. Вишнякова П.А., Холоденко И.В., Романова Н.А., **Доронин И.И.**, Сухорукова Р.Х., Молотковская И.М., Холоденко Р.В. Сравнение цитостатического действия GD2-специфических антител и доксорубина на клетках мышинной лимфы EL-4. XXIV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», тезисы докладов и стендовых сообщений. 2012. С. 61.
6. Вишнякова П.А., **Доронин И.И.**, Холоденко И.В., И.М. Молотковская, Холоденко Р.В. Изучение кросс-реактивности GD2-специфических антител. XXV Международная зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", тезисы докладов и стендовых сообщений. 2012. Т. 2. С. 35.

7. Вишнякова П.А., **Доронин И.И.**, Холоденко Р.В. Изучение вклада ганглиозида GD2 в рецепцию цитотоксического сигнала в опухолевых клетках. Ломоносов 2013: XX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. Секция «Биология», тезисы докладов. 2013. С. 147.
8. Холоденко Р.В., Вишнякова П.А., **Доронин И.И.**, Холоденко И.В., И.М. Молотковская. Роль ганглиозида GD2 в акцепции цитостатического сигнала в клетках лимфомы EL-4. XXV Международная зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", тезисы докладов и стендовых сообщений. 2013. Т. 1. С. 88.
9. **Доронин И.И.**, Вишнякова П.А., Холоденко Р.В. Перспективы использования пептидов в диагностике и терапии GD2-позитивных опухолей. XXV Международная зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", тезисы докладов и стендовых сообщений. 2013. Т. 2. С. 75.
10. **Доронин И.И.**, Вишнякова П.А., Холоденко Р.В. Сайт-направленное пегилирование Fab-фрагментов GD2-специфичных антител. Ломоносов 2013: XX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. Секция «Биология», тезисы докладов. 2013. С. 47-48.
11. **Doronin I.I.**, Kholodenko R.V. Antitumor activity of PEGylated Fab-fragments of GD2-specific antibody. *Frontiers in Immunology*, ICI-2013. 2013. doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00193.
12. Вишнякова П.А., **Доронин И.И.**, Смирнова Е.В., Свирцевская Е.В., Молотковская И.М., Холоденко Р.В. Влияние ингибирования гена GM2/GD2 синтазы на жизнеспособность опухолевых клеток. XXVI Зимняя молодежная научная школа “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”, тезисы докладов и стендовых сообщений. 2014. С. 116.
13. **И.И. Доронин**, Вишнякова П.А., Рязанцев Д.Ю., Ефремов М. А., Холоденко И.В., Молотковская И.М., Холоденко Р.В. Противоопухолевая активность пегилированных Fab-фрагментов GD2-специфических антител. XXVI Зимняя молодежная научная школа “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”, тезисы докладов и стендовых сообщений. 2014. С. 11.