

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)

На правах рукописи

Доронин Игорь Игоревич

Противоопухолевые эффекты модифицированных фрагментов GD2-специфичных
антител

Специальность 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н., Холоденко Р.В.

Москва - 2015

Оглавление

1.	Введение	3
2.	Обзор литературы	7
2.1.1	Ганглиозиды как мишени противоопухолевой терапии	7
2.1.2	Иммунотерапия с использованием моноклональных антител	20
2.1.3	Разработка и использование GD2-специфичных антител в противоопухолевой терапии 29	
2.1.4	Современные стратегии повышения эффективности GD2-направленной терапии онкологических заболеваний	42
2.1.5	Предполагаемые механизмы прямой цитотоксической активности GD2-специфичных антител 51	
2.1.6	Модифицированные фрагменты моноклональных антител в терапии онкологических заболеваний	54
3.	Основная часть	74
3.1.1	Материалы и методы	74
4.	Результаты и их обсуждение	89
4.1.1	Выбор клеточной модели для исследования действия GD2-специфичных антител и их фрагментов	89
4.1.2	Цитотоксические эффекты GD2-специфичных антител на опухолевых клеточных линиях 93	
4.1.3	Создание и экспрессия рекомбинантного scFv-фрагмента GD2-специфичного антитела 3F8	101
4.1.4	Изучение связывающей способности полученных scFv-фрагментов	106
4.1.5	Создание гибридомы, продуцирующей специфичные моноклональные антитела к опухолеассоциированному ганглиозиду GD2	108
4.1.6	Энзиматическое получение фрагментов GD2-специфичных моноклональных антител класса IgM	116
4.1.7	Энзиматическое получение Fab-фрагментов GD2-специфичных антител ME361 ...	119
4.1.8	Сравнение цитотоксических эффектов Fab-фрагментов антител ME361 с полноразмерными антителами	124
4.1.9	Пегилирование Fab-фрагментов ME361	131
4.1.10	Изучение противоопухолевых эффектов Fab-фрагментов GD2-специфичных антител, а также их модифицированных аналогов <i>in vivo</i>	136
4.1.11	Заключение и выводы	141
5.	Список сокращений	142
6.	Благодарности	144
7.	Список литературы	145

1. Введение

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. Хирургия, химиотерапия и лучевая терапия далеко не всегда дают положительные эффекты, приводящие к полной регрессии болезни, кроме того, данные способы лечения имеют серьезные побочные эффекты. 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.

За последнее десятилетие достигнут колоссальный прогресс в конструировании моноклональных антител и их производных. В настоящее время более 20 противоопухолевых препаратов данного типа применяется в клинической практике, причем за последние пять лет их число удвоилось. 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 в настоящее время проходят клинические испытания, которые свидетельствуют в пользу перспективности иммунотерапии в лечении GD2-позитивных опухолей. Однако выявлены побочные эффекты, а именно: жар, боль, сыпь, лихорадка, нейротоксичность, 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, что обусловлено низкой проникающей способностью полноразмерных иммуноглобулинов, характеризующихся большими размерами.

В последнее время появились данные о прямой индукции гибели опухолевых клеток под действием GD2-специфичных антител. Важным является то, что цитотоксическая активность моноклональных антител не опосредована классическими иммунными механизмами элиминирования опухолевых клеток, для проведения которых необходим Fc-фрагмент антител. Поскольку Fc-фрагмент в случае GD2-позитивных опухолей определяет ряд побочных эффектов и, возможно, его наличие в структуре иммуноглобулина не является ключевым для положительных противоопухолевых эффектов полноразмерных антител, то открывается новый подход к исследованию GD2-связывающих фрагментов антител в качестве индукторов гибели опухолевых клеток. Данные фрагменты, лишённые Fc-фрагмента, имеют потенциальные терапевтические преимущества по сравнению с полноразмерными GD2-специфичными антителами, в случае сохранения ими цитотоксических свойств. Так, фрагменты антител, обладая значительно меньшим размером, чем антитела, будут иметь лучшую способность проникновения вглубь солидных опухолей, а также их использование позволит убрать побочные эффекты, обусловленные Fc-фрагментом антител. 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, а также 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.

В первой части работы произведена системная оценка цитотоксических эффектов GD2-специфичных антител на различных опухолевых клеточных линиях. Вторая часть работы посвящена получению функционально активных фрагментов GD2-специфичных антител. В третьей части работы исследуются противоопухолевые эффекты модифицированных фрагментов GD2-специфичных моноклональных антител в системе *in vivo*.

Цель работы и основные задачи исследования

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 KLN-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 их времени циркуляции в организме.

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.

2. Обзор литературы

2.1.1 Ганглиозиды как мишени противоопухолевой терапии

Опухолевые маркеры для иммунотерапии онкологических заболеваний

К началу 2000-х годов знания о биологии рака значительно расширились, а существенные ресурсы, выделенные на исследования и разработку принципиально новых методов терапии рака, привели к рекордному числу новых противоопухолевых препаратов, дошедших до стадии клинических испытаний.

За последние годы иммунотерапия с использованием моноклональных антител (мАт) доказала свою эффективность в лечении ряда онкологических заболеваний. В настоящее время в США разрешены к применению в клинике свыше 20 препаратов на основе мАт, при этом еще более 200 препаратов проходят клинические испытания [1]. Фундаментальной основой для развития иммунотерапевтических методов лечения онкологических заболеваний послужили данные об экспрессии опухолевыми клетками определенных антигенов и возможности нацеливания на них иммунной системы организма. Определение мембранных антигенов позволило выявить целый ряд мишеней, которые гиперэкспрессированы, мутированы или селективно экспрессированы опухолевыми клетками по сравнению с клетками нормальных тканей. Ключевым моментом являлась идентификация антигенов, подходящих для дальнейшей терапии при помощи препаратов моноклональных антител.

Безопасность и эффективность препаратов терапевтических мАт в онкологии варьирует в зависимости от природы антигена-мишени. В идеале антиген-мишень должен быть экспрессирован на высоком уровне, его поверхностная локализация должна быть гомогенной, постоянной и специфичной исключительно для опухолевых клеток.

В настоящее время как минимум 90 различных антигенов являются мишенями для противоопухолевых моноклональных антител; в таблице 1 представлены наиболее исследованные мишени противоопухолевой терапии.

Опухолевые антигены, используемые в качестве мишеней в иммунотерапии онкологических заболеваний, можно разделить на несколько групп:

А) Поверхностные гемопозитические антигены-мишени, например, CD20, CD30, CD33, CD52 и проч.

Б) Поверхностные антигены солидных опухолей. Эта группа антигенов разнообразна, в нее входят белки, углеводы, гликопротеины и гликолипиды, которые экспрессируются на поверхности как нормальных, так и опухолевых клеток, в частности, к ним можно отнести СЕА, ЕpСАМ, GD2, GD3 и проч.

В) Рецепторы факторов роста, такие как рецепторы эпидермального фактора роста, EGFR (или ERBB1), HER2 (или ERBB2), HER3 (или ERBB3), рецептор фактора роста гепатоцитов, MET (или HGFR), рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 типа (IGF1R), рецептор эфрина А3 (EPHA3), TNF-опосредованный апоптоз-индуцирующий рецептор 1 типа TRAIL R1 (или TNFR SF10A), TRAIL R2 (или TNFRSF 10B), или лиганд рецептора активатора ядерного фактора транскрипции NF каппа В (RANKL или TNF SF11).

Г) Факторы, способствующие ангиогенезу. Эта группа включает фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), интегрин $\alpha V\beta 3$ и интегрин $\alpha 5\beta 1$.

Д) Антигены стромы и внеклеточного матрикса также представляют собой терапевтические мишени и включают в себя белок, активирующий фибробласты (FAP) и тенасцин.

Таблица 1. Опухлеассоциированные антигены, являющиеся мишенями для препаратов терапевтических моноклональных антител [2].

Тип антигена	Примеры антигенов	Названия терапевтических препаратов	Опухоли, экспрессирующие данный антиген
CD-антигены	CD20	Rituximab Ibritumomab tiuxetan Tositumomab	Неходжкинские лимфомы Лимфомы
	CD30	Brentuximab vedotin	Лимфома Ходжкина
	CD33	Gemtuzumab ozogamicin	Острый миелогенный лейкоз
	CD52	Alemtuzumab	Хронический лимфоцитарный лейкоз
Гликопротеины, экспрессируемые солидными опухолями	EpCAM	IGN101 adecatumumab	Эпителиальные опухоли (рак молочной железы, кишечника, легких)
	CEA	Labetuzumab	Рак молочной железы, кишечника, легких
	TAG-72	CC49 (minretumomab)	Рак молочной железы, кишечника и легких
	CAIX	cG250	Почечно-клеточная карцинома
	PSMA	J591	Карцинома простаты

	Белок, связывающий фолаты	MOv18 MORab-003 (farletuzumab)	Опухоли яичников
Гликолипиды	Ганглиозиды (в частности GD2, GD3, GM2)	3F8, ch14.18, KW-2871	Нейроэктодермальные опухоли и некоторые эпителиальные опухоли
Углеводы	Le(y)	hu3S193 IgN311	Рак молочной железы, кишечника, легких, простаты
Мишени анти-ангиогенных моноклональных антител	VEGF	Bevacizumab	Сосудистые опухоли
	VEGFR	IM-2C6 CDP791	Солидные опухоли эпителиального происхождения
	Integrin $\alpha V\beta 3$	Etaracizumab	Сосудистые опухоли
Молекулы сигналинга роста и дифференцировки	EGFR	Cetuximab, panitumumab, nimotuzumab 806	Глиомы, рак легких, молочной железы, кишечника, опухоли головы и шеи
	ERBB2	Trastuzumab pertuzumab	Рак молочной железы, кишечника, легких, яичников, простаты
	MET	AMG 102, METMAB SCH 900105	Рак молочной железы, яичников, легких
	IGF1R	AVE1642, IMC-A12, MK-0646, R1507 CP 751871	Глиома, рак легких, молочной железы, опухоли головы и шеи, простаты, опухоли щитовидной железы
	EPHA3	KB004 ША4	Опухоли легких, почек, кишечника, меланома, глиома, гематологические опухоли
	TRAILR1	Maratumumab (HGS-ETR1)	Опухоли кишечника, легких, поджелудочной железы, гематологические опухоли
	TRAILR2	HGS-ETR2 CS-1008	Опухоли кишечника, легких, поджелудочной железы, гематологические опухоли
	RANKL	Denosumab	Рак простаты и метастазы в костях
Стромальные и	FAP	Sibrotuzumab	Колоректальный рак, рак

внеклеточные матриксные антигены		F19	молочной железы, легких, поджелудочной железы, опухоли головы и шеи
	Tenascin	81C6	Глиома, рак молочной железы, рак простаты

Мишенями для иммунотерапии рака могут служить не только белки, но и гликофинголипиды, в частности - ганглиозиды. Известно, что при развитии неоплазии изменяется профиль экспрессии ганглиозидов. В опухолевых клетках появляются ганглиозиды, которые в нормальных клетках либо отсутствуют, либо экспрессированы в ограниченном количестве, что позволяет рассматривать данные молекулы в качестве очень перспективных молекул для разработки противоопухолевых иммунотерапевтических методов.

Структура и биологические функции ганглиозидов.

Ганглиозиды – одни из интереснейших компонентов мембран эукариотических клеток, относящихся к семейству гликофинголипидов (ГСЛ). Ганглиозиды содержат в составе олигосахаридной цепи одну или несколько сиаловых кислот, N-ацетильных производных нейраминовой кислоты. Центральным элементом гликофинголипидов является церамид, состоящий из сфингозина, связанного амидной связью с жирной кислотой. Ацильные цепи церамида являются гидрофобной частью сфинголипидов. Большинство сфингозинов имеют ацильные остатки, состоящие из 18 и 20 атомов углерода и несут двойную связь в положении C4 - C5. В ГСЛ церамид связан с сахаридной структурой, образуя соединения гликофинголипидного ряда: нейтральные гликофинголипиды, включая цереброзиды, несущие единственный моносахаридный остаток (глюкозид или галактозид), и кислые гликофинголипиды, которые несут олигосахарид, содержащий сиаловую кислоту (ганглиозиды). Олигосахаридная цепь ганглиозидов может содержать от двух до 10 и более углеводных остатков (См. рисунок 1) [3].

Впервые ганглиозиды были обнаружены Эрнстом Кленком в 1942 году в ганглиях, откуда и произошло их название. В различных тканях и органах обнаруживается большое разнообразие ганглиозидов, однако особенно обогащены этими ГСЛ клетки нервной системы, где их содержание в сером веществе достигает 25% от общего количества липидов [4]. Ганглиозиды нервных клеток концентрируются в синаптической области и в зоне растущих конусов развивающихся аксонов. Большое число вариаций углеводородных и церамидных структур создает значительное молекулярное разнообразие данного класса соединений. К 2009 году у млекопитающих было охарактеризовано около 188 типов ганглиозидов [5].



Рисунок 1. Общая структурная формула ганглиозидов [нарисован J. Keimel, ChemDraw].

Состав и метаболизм гликофинголипидов постоянно изменяется в зависимости от процессов, протекающих в клетке. Специфические изменения происходят в течение клеточной пролиферации, прохождения клеткой различных фаз клеточного цикла, дифференцировки, а также при эмбриональном развитии мозга и при трансформации клеток. Например, в процессе эмбрионального развития коры головного мозга около половины пролиферирующих нейронов и глиальных клеток подвергаются апоптозу [6]. Эта фаза созревания совпадает с переключением синтеза ганглиозидов в развивающихся тканях мозга от простых ганглиозидов GM3 и GD3 на сложные, b-серии: GD1b, GT1b, GQ1b. Такое же переключение синтеза наблюдается при дифференцировке эмбриональных нервных стволовых клеток, полученных из тератокарциномы. Эти факты свидетельствуют о том, что состав ганглиозидов уникален для разных типов клеток и различных стадий их созревания, и что подобная специфичность может играть определенную функциональную роль.

Главным образом ганглиозиды локализованы на внешней стороне плазматических мембран клеток. При этом липидная часть ганглиозидов закорена в мембране, в то время как гидрофильные домены направлены в межклеточное пространство. Именно такая структурная ориентация во многом определяет основные физиологические функции ганглиозидов. Данные молекулы опосредуют контактное торможение, адгезию клеток, контроль клеточного роста и участвуют в формировании липидных рафтов, регулирующих активность многих клеточных процессов [7], помимо этого, известно, что ганглиозиды являются рецепторами для многих вирусов, бактерий и их токсинов. Ганглиозиды вовлечены в процессы межклеточного узнавания и сигнальной трансдукции внутри специфических микродоменов — кавеол, а также липидных рафтов, или обогащенных гликофинголипидами микродоменов, совместно с

другими мембранными компонентами, такими как сфингомиелин и холестерин. Показано участие определенных типов ганглиозидов, входящих в состав липидных рафтов, в сопряжении рецепторов ростовых факторов с внутриклеточными тирозинкиназами [8], их влияние на интегриновую функцию за счет формирования комплекса с тетраспанином CD9 [9]. Зарегистрировано также взаимодействие и активация ганглиозидами таких цитоплазматических модуляторов сигналов, как киназы семейства Src и G-белки, присутствующие в микродоменах [10]. Ганглиозид GM1 действует как функциональный корецептор для трансмембранного рецептора ростового фактора фибробластов 2 (FGFR-2).

Все больше данных свидетельствуют о том, что ганглиозиды колокализированы в микродоменных структурах с некоторыми сигнальными молекулами и молекулами адгезии [11, 37]. Более того, было показано, что ганглиозиды присутствуют не только в плазматической мембране, но и в мембране клеточного ядра. Предполагается, что там они играют важную роль в модуляции внутриклеточного и внутриядерного кальциевого гомеостаза, а также регуляции ряда других клеточных функций [12].

Биологическая значимость ганглиозидов была показана на нокаутных мышах, дефицитных по ганглиозид-синтетазам. В гистологических исследованиях нокаутных мышей ST-I, дефицитных по ганглиозиду GD3, была обнаружена селективная деградация органа Корти (сенсорный орган слуха в раковине улитки). Это наблюдение доказывает роль ганглиозида GD3 и его производных в процессах функционального созревания улитки в период раннего развития. Недавно было показано, что поведенческий фенотип нокаутных мышей ST-I напоминает расстройства поведения человека по типу синдрома дефицита внимания, ассоциированного с гиперактивностью, что указывает на возможную роль гликофинголипидов в поддержании нейropsychического статуса [13]. ST-II нокаутные мыши, дефицитные по b- и c-сериям ганглиозидов, характеризуются нормальной морфологией нервных тканей, однако, регенеративная способность поврежденного подъязычного нерва у них серьезно ослаблена [14]. Мыши, у которых за счет нарушения работы гена GalNAcT отсутствует комплекс гексозамин-содержащих ганглиозидов (таких как GM1, GD1a, GD1b и GT1b), характеризовались нормальным поведением и нормальной гистологией мозга, однако в старости у них была серьезно нарушена моторная координация. Нокаутные мыши с одновременно отключенными генами GalNAcT и ST-II преимущественно экспрессировали ганглиозид GM3 с отсутствием гексозамин-содержащих ганглиозидов. Данные мыши характеризовались потерей веса, серьезными моторными и сенсорными дисфункциями, а также существенным ослаблением способности к пространственному обучению с возрастом. Мыши, нокаутные по всем ганглиозидам были слабо жизнеспособны, большинство особей погибало в возрасте 3 недель. Они отличались высокой степенью вакуолизации клеток мозжечка и спинного белого вещества,

дегенерацией аксонов с нарушением аксон-глиальных взаимодействий, а также высоким уровнем апоптоза нейронов. Однако, до конца не ясно, являются ли данные патологии следствием отсутствия ганглиозидов, или же они вызваны ненормальным накоплением предшественников ганглиозидов в указанных клетках [15].

В последнее время ганглиозиды становятся объектами пристального внимания в области биологии стволовых клеток. Стволовые клетки представляют собой недифференцированные клетки, обладающие значительным пролиферативным потенциалом и способностью к самообновлению с сохранением плюрипотентности или мультипотентности. В последние годы данные клетки привлекают значительное внимание вследствие их огромного биологического и медицинского потенциала с точки зрения регенеративной медицины [16]. На поверхности стволовых клеток было идентифицировано большое количество уникальных ганглиозидных маркеров. Например, SSEA-4 (относящийся к глобо-серии ганглиозидов, имеющий NueAca2-3Galb1-3GalNAcb1-R структуру), специфично экспрессируется плюрипотентными эмбриональными стволовыми клетками человека и мезенхимальными стволовыми клетками. Ганглиозид GD3 экспрессируется в мышинных и человеческих нейрональных стволовых клетках, а мезенхимальные стволовые клетки человека, помимо SSEA-4, экспрессируют ганглиозид GD2 [17]. Таким образом, ганглиозиды могут быть использованы в качестве специфических клеточных маркеров для идентификации и выделения определенных субпопуляций стволовых клеток. Аналогичная информация сообщалась о субпопуляциях стволовых клеток опухолей мозга. Данные клетки имеют ряд характеристик стволовых клеток, таких как способность к самообновлению и мультипотентность и, более того, способность вызывать и поддерживать формирование опухолей мозга. Эти клетки экспрессируют с-серии ганглиозидов, также известных как A2B5-антигены, которые характерны для эмбриональных клеток. Эти ганглиозиды могут использоваться не только в качестве биомаркеров стволовых опухолевых клеток, но и как мишени для направленного лечения опухолей мозга [16].

Представленные данные свидетельствуют, что ганглиозиды играют важную роль в различных физиологических процессах разных типов клеток за счет регуляции активностей трансмембранных рецепторов и путей передачи сигналов для обеспечения процессов жизнедеятельности.

Ганглиозиды и рак

Онкология является одной из наиболее активных областей изучения ганглиозидов с тех пор, как несколько групп в конце 1960-х в начале 1970-х годов прошлого столетия охарактеризовали сложные ганглиозиды как опухолеспецифические антигены. Сравнение опухолевых тканей с их соответствующими нормальными тканями показало, что изменяется

как уровень экспрессии ганглиозидов, так и появляются новые сложные ГСЛ, отсутствующие или редко экспрессируемые нормальными клетками. Появление новых типов ганглиозидов связано с изменениями в их биосинтезе. Все еще не ясно, являются ли подобные изменения (гиперэкспрессия одних и ослабление экспрессии других ганглиозидов) причиной или следствием онкогенной трансформации.

Большое число опухолей гиперэкспрессируют опухолеассоциированные ганглиозиды. Например, в клетках меланомы и нейробластомы наблюдается гиперэкспрессия GD3, GD2 и GM2 [18], повышенная экспрессия GD1a, GM1, GM2 показана в клетках карциномы [19], GD2 экспрессируется клетками саркомы мягких тканей, остеосаркомы и мелкоклеточного рака легких [20]. Ганглиозид GM3 представлен в составе нормальных тканей, но в сыворотке крови раковых больных его уровень резко возрастает. То же самое характерно и для ганглиозида GD3. Увеличение количества GM2 наблюдается в мышечной карциноме и в клетках лимфомы EL-4, а также в человеческой карциноме легких. Отношение количества ганглиозидов варьирует от одного типа опухоли к другому. Показано, что отношение количества GM3/GD3 коррелирует со степенью злокачественности опухоли. Например, для соотношения 1:1,5 прогноз лечения онкологического заболевания является благоприятным. Помимо этого, в неопластических тканях обнаруживаются ганглиозиды, не характерные для нормальных нетрансформированных клеток этой ткани. В частности, одним из таких ганглиозидов является GD2. В норме экспрессия этого ганглиозида, также, как и ганглиозида GM2, ограничивается нервными клетками, однако в случае онкологической трансформации они обнаруживаются в клетках меланомы и ряда других опухолей [21].

Многочисленные исследования показали, что опухолеассоциированные ганглиозиды, появляющиеся в результате онкогенной трансформации, играют ключевую роль в инвазии и метастазировании ряда опухолей и индуцируют опухолеассоциированный ангиогенез. Прежде всего, установлено, что опухолевые клетки отличаются по составу ганглиозидов. Так, например, при подкожном введении клеток меланомы крысам в образующейся подкожной опухоли ганглиозидный состав не изменяется по сравнению с таковым исходной меланомы, тогда как в растущих в легких узелках метастазов наблюдается ингибирование биосинтеза ганглиозидов и накопление лактозилцерамида [22].

Исследования, проводившиеся в различных лабораториях, показали, что уменьшение количества сложных ганглиозидов является типичным для многих типов трансформированных клеток и особенно ярко выражено в высоко метастазирующих формах опухолей. Были выявлены различия ганглиозидного состава в двух меланомах человека разного гистогенеза — в меланомах кожи и радужной оболочки глаза. Кожная меланома содержала до 75% GM3, значительные количества GD3, а также GD2 и GM2 и 9-O-Ac-GD3. В меланоме радужной

оболочки наблюдалось более 90% GM3, понижение содержания ганглиозида GD3, GD2 и отсутствие GM2 и 9-O-Ac-GD3. Авторы полагают, что различие в метастатической активности этих двух типов меланом (низкая активность в меланоме радужной оболочки и высокая — в меланоме кожи) объясняется различиями в экспрессии ганглиозидов и их составе. В связи с этим, можно сделать вывод о том, что ганглиозидный состав метастазирующих клеток отличается от клеток первичного опухолевого очага и характеризуется уменьшением содержания сложных ганглиозидов. Более того, ганглиозидные профили низко- и высокометастазирующих клеток одной и той же опухоли существенно различаются между собой, при этом в высокометастазирующих клетках обнаруживается значительное содержание ганглиозидов GD2, GD3 и GM2.

Недавно было установлено, что в процессы клеточной адгезии вовлечены, так называемые, микродомены (гликосинапсы), обогащенные гликофинголипидами. Было обнаружено, что процесс адгезии клеток мышинной меланомы B16 опосредуется расположенными на поверхности микродоменами, обогащенными ганглиозидом GM3. Подобный вывод был сделан вследствие того факта, что в клетках меланомы более 90% ганглиозида GM3 обнаруживается именно в этих микродоменах. Кроме того, в них присутствуют также такие сигнальные молекулы, как c-Src, Ras, Rho и FAK, то есть GM3-обогащенный микродомен является структурной и функциональной единицей для инициации GM3-зависимой клеточной адгезии и связанной с ней сигнальной трансдукции [23].

Известно, что малигнизированные клетки сбрасывают ганглиозиды как в кровотоки (*in vivo*), так и в среду культивирования (*in vitro*). Такой шеддинг ганглиозидов происходит значительно легче для структур, несущих жирнокислотные остатки C12 - C20. Шеддинг опухолевых ганглиозидов с клеточной поверхности показан для большого числа опухолевых клеток, включая клетки нейробластомы, лимфомы, меланомы [24], опухолевые клетки мозга также сбрасывают ганглиозиды [25]. Опухолевые ганглиозиды, свободно циркулирующие в крови, ингибируют некоторые иммунные ответы как *in vivo*, так и *in vitro*. Их сброс с поверхности трансформированных клеток стимулирует развитие опухолей у мышей и у человека [26]. Например, у пациентов с нейробластомой шеддинг опухолевых ганглиозидов напрямую коррелирует со степенью и скоростью развития опухоли; среднее время жизни пациентов с высокими уровнями циркулирующего GD2 (>568 пмоль/мл) значительно меньше (не более 9 месяцев), чем пациентов с низкими концентрациями GD2 (<103 пмоль/мл; 28 месяцев).

Ганглиозиды, являются мощными иммуносупрессорами [27]. Несколькими группами исследователей было показано, что ганглиозиды, сброшенные с поверхности опухолевых клеток, могут вызывать локальные иммуносупрессирующие эффекты, а также ингибируют IL-2

ответы [28], причем простые ганглиозиды с короткими углеводными цепями (такие как GM4) обладают наибольшей иммуносупрессирующей активностью. В ходе экспериментов *in vitro* на мононуклеарах периферической крови, стимулированных лектинами или растворимыми антигенами, они существенно ингибировали клеточную пролиферацию. В основе иммуносупрессии, вызываемой ганглиозидами, сброшенными с поверхности опухолевых клеток, лежат три основных этапа: шеддинг ганглиозидов опухолевыми клетками; связывание с лейкоцитами в микроокружении опухоли; и непосредственное воздействие на клетки-мишени. Было установлено, что ганглиозиды, сброшенные с поверхности клеток лимфомы, встраиваются в плазматическую мембрану фибробластов даже при очень низких концентрациях (0.005 мкМ). Кроме того, ганглиозиды, сброшенные опухолевыми клетками, гораздо более эффективно встраиваются в мембрану клеток-мишеней и в большей степени проявляют иммуносупрессирующие свойства, чем очищенные экзогенно добавленные в культуральную среду ганглиозиды в больших концентрациях. Был примерно оценен уровень связывания ганглиозидов с клетками (1×10^7 молекул/клетка за 48 часов), который, в случае с мононуклеарами периферической крови человека, соответствует 70-90% ингибированию их антиген-индуцируемой пролиферации [29]. Такое негативное воздействие на иммунную систему опухолевыми ганглиозидами может служить существенным фактором защиты опухоли от разрушения иммунной системой.

Приведенные выше данные показывают, что ганглиозиды активно участвуют в миграции, инвазии и адгезии опухолевых клеток, а также в иммуносупрессии. При этом степень их активности зависит от структуры углеводной цепи гликолипида [30]. Одним из наиболее интересных ганглиозидов является опухолеассоциированный ганглиозид GD2.

Участие ганглиозида GD2 в онкологическом процессе

Ганглиозид GD2 (См. Рисунок 2) относится к b-серии ганглиозидов, для его синтеза необходимы ферменты GD3-синтаза и GM2/GD2-синтаза, его предшественником является ганглиозид GD3. Нормальные ткани обычно экспрессируют ганглиозиды a-серии, в то время как ганглиозиды b-серии экспрессируются в период внутриутробного развития и их экспрессия ограничена, прежде всего, нервной системой и меланоцитами кожи. Экспрессия GD2 в нормальных фетальных и взрослых тканях преимущественно ограничивается центральной нервной системой, периферическими нервами и меланоцитами кожи, хотя GD2 также обнаруживается в строме некоторых нормальных тканей и в белой пульпе селезенки [31]. Он равномерно экспрессируется преимущественно на клеточной поверхности опухолевых клеток. Его функции до конца не выяснены, считается, что он участвует в адгезии клеток, в частности – в прикреплении опухолевых клеток к белкам внеклеточного матрикса.

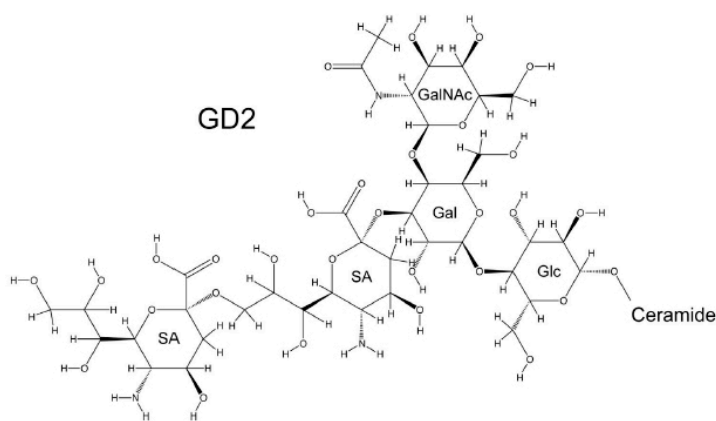


Рисунок 2. Структура ганглиозида GD2.

Ганглиозид GD2 гиперэкспрессируется опухолями нейроэктодермального происхождения и саркомами, включая нейробластомы, ретинобластомы, меланомы, мелкоклеточный рак легких, опухоли головного мозга, остеосаркомы, рабдомиосаркомы, саркомы Юинга у детей и подростков. У взрослых он также обнаруживается в случае липосарком, фибросарком, лейомиосарком и других сарком мягких тканей [32]. Помимо этого, в последних исследованиях показано присутствие мембранного GD2 на поверхности опухолевых стволовых клеток рака груди, а также нейроэктодермальных и мезенхимальных стволовых клетках [33]. Экспрессия GD2 в данных опухолевых клетках регулируется активностью GM2/GD2 синтазы, а также количеством ганглиозида GD3. В клетках нейробластомы и глиомы обнаруживается высокий уровень экспрессии мРНК GM2/GD2 синтазы, а так же высокая активность данного фермента, что приводит к образованию больших количеств GD2. В то же время, для клеток меланомы характерен значительно более низкий уровень экспрессии мРНК данного фермента и преобладание GD3 в ганглиозидном составе клеток [34].

В качестве опухолевого антигена GD2 усиливает пролиферацию и инвазивность клеток мелкоклеточного рака легких и клеток остеосаркомы [35]. Один из возможных механизмов усиления пролиферативной способности GD2-позитивных опухолевых клеток опухоли был недавно предложен Cazet и соавт. [36]. Показано, что увеличение уровня экспрессии GD2 в клетках рака молочной железы (ER-, PR- и Her-негативные) привело к усилению их пролиферации путем прямой индукции конститутивной активации протоонкогена c-Met. Помимо этого, высказано предположение, что GD2 усиливает адгезию тромбоцитов к внеклеточному коллагеновому матриксу путем увеличения уровня интегрин $\alpha 2 \beta 1$ -опосредуемого фосфорилирования тирозина p125FAK, и обеспечивает метастазирование клеток нейробластомы. Связывание ганглиозида GD2 на поверхности клеток с GD2-специфичными моноклональными антителами значительно снижает уровень пролиферации и способность к инвазии, а также непосредственно индуцирует гибель опухолевых клеток [37].

В связи с высоким уровнем экспрессии в ряде опухолей и ограниченной экспрессией в нормальных тканях ганглиозид GD2 можно рассматривать в качестве идеальной потенциальной мишени для разработки методов противоопухолевой иммунотерапии. В рамках программы по приоритизации наиболее интересных опухолевых антигенов, National Cancer Institute присвоил ганглиозиду GD2 12 место из 75 потенциальных мишеней для противоопухолевой терапии. Данное исследование основывалось на сравнении терапевтических функций, иммуногенности, роли антигена в онкогенности, специфичности, уровне экспрессии и процента антиген-позитивных клеток, экспрессии на стволовых клетках, количеству пациентов с антиген-положительными опухолями, количеству эпитопов антигена и клеточной локализации антигена [38]. Ежегодно только в США количество диагнозов GD2-позитивных опухолей растет более чем на 200 тыс. Следует отметить, что данные опухоли характеризуются высоким процентом смертности (20-80%), и от 60 до 100% из них (в зависимости от типа опухоли) являются кандидатами для применения GD2-специфичных иммунотерапевтических методов.

Стратегии использования ганглиозида GD2 в терапии рака

Изначально рассматривалось два основных иммунотерапевтических подхода к использованию терапевтического потенциала опухолеассоциированного ганглиозида GD2 в клинике, а именно: создание противоопухолевых вакцин, способных индуцировать собственный иммунный ответ приводящий к элиминированию опухоли, а также пассивная иммунотерапия с использованием различных типов GD2-специфичных антител.

Впервые GD2-специфичные антитела проявили большой терапевтический потенциал в терапии детской нейробластомы, так что разработка вакцин, способных индуцировать мощный ответ с образованием собственных GD2-специфичных антител на тот момент выглядела наиболее безопасной и оправданной. Однако как оказалось, противоопухолевые вакцины на основе ганглиозидов достаточно сложно получить вследствие слабой иммуногенности и селективности данных антигенов. При этом вакцинация чистыми ганглиозидами, в лучшем случае, индуцирует очень низкий титр ганглиозид-специфичных антител класса IgM с очень коротким периодом полужизни, что недостаточно для развития терапевтически эффективного иммунного ответа.

Одним из путей повышения иммуногенности ганглиозидов является их конъюгация с белком-носителем и/или добавление адъюванта. Так, ганглиозид GD2, ковалентно связанный с сильным иммуногенным агентом — гемоцианином улитки (KLH), используемым в качестве носителя, в присутствии адъюванта QS-21, был способен вызвать нормальный иммунный ответ с продукцией антител, эффективных против GD2-позитивных микрометастаз [39]. Однако ответ на вакцину, основанную на использовании конъюгата GD2-KLH, все же был недостаточно

сильным, и в качестве более эффективной альтернативы была разработана вакцина на основе лактон-GD2-KLN. У пациентов с меланомой данная вакцина индуцировала образование GD2-специфичных антител, способных активировать механизмы комплемент зависимой цитотоксичности (CDC), однако серьезного клинического эффекта обнаружено не было [40]. Следует отметить, что химическая конъюгация ганглиозидов требует специальных подходов, поскольку в ходе реакции структура антигена может измениться, вследствие чего может уменьшиться или полностью утратиться его антигенность. Поэтому параллельно предпринимались попытки введения сложных смесей, содержащих ганглиозид в свободном виде, например, сапонин/холестерин/адъювант/ганглиозид [41]. Эти комплексы имеют гидрофобное ядро и полярный внешний слой, что позволяет ганглиозидам встраиваться в такие структуры, экспонируя при этом наружу свою углеводную часть. Помимо сравнительно слабой иммуногенности, ганглиозиды достаточно сложно синтезировать. Для того чтобы преодолеть эти ограничения были разработаны вакцины на основе GD2-мимикрирующих пептидов а также анти-идиотипических антител. Такие антитела могут быть получены при помощи мышей или крыс, иммунизированных GD2-специфичными антителами [42]. При этом, такой подход характеризуется минимальными побочными эффектами: локальным отёком в месте инъекции, незначительным повышением температуры и ознобом, однако клинический ответ также является слабым [43]. В настоящее время, эффективных вакцин, способных индуцировать серьезный иммунный ответ с выработкой GD2-специфичных антител не разработано.

В силу того, что активная иммунизация через вакцинацию имеет ряд ограничений, вызванных низкой иммуногенностью ганглиозидов и сложностями, связанными с их модификацией, большинство последующих исследований было связано с изучением эффектов пассивной иммунизации. Под пассивной иммунизацией понимается непосредственное введение GD2-специфичных антител пациентам. Как оказалось, вводимые GD2-специфичные антитела могут элиминировать опухолевые клетки, экспрессирующие ганглиозиды, за счет активации различных механизмов, включая ADCC, CDC и прямую индукцию клеточной гибели, либо же mAb могут быть конъюгированы с различными цитотоксическими препаратами для усиления их противоопухолевого действия. GD2-специфичные антитела проявили многообещающие положительные противоопухолевые эффекты в ходе большого числа экспериментов *in vivo* [44] и получили ряд положительных оценок в рамках проведения клинических испытаний, особенно для терапии нейробластомы и меланомы [63]. В ходе развития данного подхода в рамках клинических испытаний, был обнаружен ряд побочных эффектов и сложностей, однако многообещающие терапевтические эффекты использования mAb для терапии GD2-позитивных опухолей обуславливают активное развитие и совершенствование этого подхода в настоящее время.

2.1.2 Иммуноterapia с использованием моноклональных антител

Антитела являются модульным типом защитной системы организма, который идентифицирует и нейтрализует любые чужеродные объекты типа бактерий и вирусов. Антитело распознает специфический антиген в качестве единственной цели за счет антиген-связывающего участка, называемого паратопом. Паратоп антитела является уникальным для конкретного эпитопа антигена, что обеспечивает специфическое связывание антитела с антигеном.

Иммуноterapia онкологических заболеваний, основанная на применении мАт, активно развивалась на протяжении последних 20-25 лет и на сегодняшний день представляет собой один из самых успешных подходов, используемых для лечения пациентов с гематологическими и солидными опухолями. В качестве противоопухолевых препаратов, как правило, используют молекулы IgG определенной специфичности. Молекулярная масса IgG составляет около 150 кДа.

Компактные структуры антител, скрепленные дисульфидной связью, называются доменами. В структуре молекул IgG различают: переменные V-домены легких (VL) и тяжелых (VH) цепей, расположенные в N-концевой части молекулы; C-домены константных участков легких цепей (CL); C-домены константных участков тяжелых цепей (CH1, CH2, CH3). Между CH1 - и CH2-доменами IgG находится шарнирный участок антитела, содержащий большое количество пролина и цистеина (Рисунок 3).

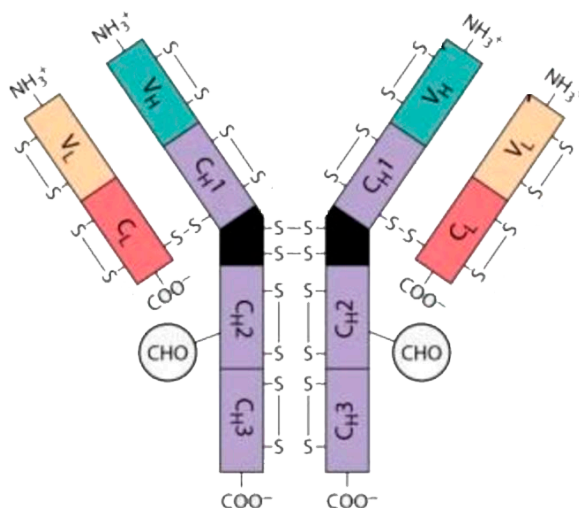


Рисунок 3. Строение молекулы IgG.

В связи с тем, что прямое получение человеческих антител для иммунотерапии изначально не представлялось возможным, терапевтические моноклональные антитела были исключительно мышиного происхождения. В клинике данный тип антител имеет ряд существенных ограничений, в том числе малое время жизни и высокую иммуногенность [45].

Развитие гибридной технологии позволило к настоящему моменту получить сотни моноклональных антител, специфичных к различным опухолевым антигенам. Современные технологии позволяют нарабатывать большие объемы высокоспецифичных антител, патентованных для использования против широкого спектра заболеваний. Помимо моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридом, данные клетки служат стартовым материалом для получения рекомбинантных антител и их фрагментов с использованием методов генной инженерии.

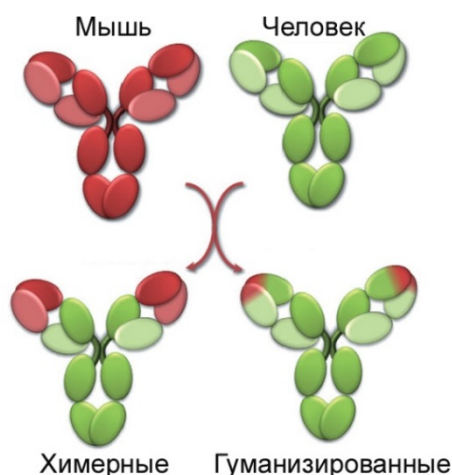


Рисунок 4. Химерные и гуманизированные антитела. Мышиные последовательности выделены красным цветом, человеческие – зеленым. Светлые тона для легких цепей и темные для тяжелых [46].

Развитие технологий инжиниринга рекомбинантных белков, получение трансгенных мышей и использование метода фагового дисплея привело к появлению химерных, гуманизированных и полностью человеческих мАт, которые значительно расширили возможности их применения в терапии [46]. Химерные антитела конструируются путем слияния мышиных переменных регионов с человеческими константными. Гуманизированные мАт получают путем трансплантации мышиных антиген связывающих регионов (CDR – гипервариабельных участков) (Рисунок 4). К сожалению, гуманизированные антитела зачастую имеют более низкую аффинность, чем мышиные антитела и требуют дальнейших модификаций, к примеру, введение мутаций в CDR повышает как специфичность, так и аффинность.

Все существующие методы гуманизирования антител можно разделить на две группы: рациональные и эмпирические. Рациональные методы основаны на так называемом цикле дизайна, который включает генерирование небольшого числа вариантов, основанных на информации о структуре антитела и его генов, с последующим анализом и выбором наиболее оптимального варианта. К данным методам относят инъекцию гипервариабельных участков

антител мыши или небольшой их части, отвечающей за специфичность, на каркас иммуноглобулина человека; ремоделирование поверхности мышиного антитела с приближением её к структуре человеческого антитела; супергуманизацию антител на основе выявления и удаления из молекулы иммуноглобулина мыши потенциальных эпитопов для главного комплекса гистосовместимости и Т-клеток. Эмпирические методы подразумевают получение больших комбинаторных библиотек и селекции необходимых антител при помощи дисплейных технологий. Данные методы наиболее оптимальны для одноцепочечных scFv-фрагментов антител, которые могут быть превращены в моногенные mAb путем слияния с константным Fc-фрагментом и димеризации, а также реконструированы в полноразмерное антитело канонического типа [134].

С 1997 года US FDA одобрила свыше 30 препаратов моноклональных антител и их производных, на стадии клинических испытаний так же находится большое число перспективных препаратов этого типа. В 2007 году 8 различных препаратов mAb были проданы на суммы более \$1 млрд., при этом Ритуксан (Rituximab, Genentech, США) стал настоящим бестселлером, его суммарные продажи превысили \$5.2 млрд. Большинство продуктов одобренных FDA для клинического применения в США представлены препаратами на основе полноразмерных моноклональных антител, также существует 3 препарата на основе фрагментов моноклональных антител. Следует отметить, что количество потенциальных препаратов mAb и их производных постоянно растет за счет расширения знаний в области инжиниринга антител, их структуры и функций [47]. В настоящее время среди противоопухолевых моноклональных антител клинические испытания проходят 165 препаратов, из которых 89 (54%) находятся в фазе I, 64 (39%) в фазе II и 12 (7%) в III фазе клинических испытаний. При этом канонические полноразмерные молекулы IgG, характеризующиеся моноспецифичностью и бивалентностью взаимодействия с антигеном, составляют порядка половины от всех разрабатываемых противоопухолевых препаратов mAb. Препараты на основе модифицированных mAb или их фрагментов, а также их конъюгаты с лекарственными препаратами (включая химиопрепараты), обладают мультиспецифичностью или повышенной функциональной активностью. Фрагменты антител и их конъюгаты составляют 53% от всех разрабатываемых препаратов моноклональных антител на I фазе клинических испытаний и 38% и 33% для II и III фаз, соответственно.

Механизмы действия препаратов mAb на клетки-мишени разнообразны и не до конца изучены. Терапевтические препараты mAb могут осуществлять своё действие при помощи различных механизмов, которые можно разделить на несколько основных групп (Рисунок 5). К первой группе можно отнести механизмы регуляции взаимодействия антигена или рецептора (mAb могут негативно влиять на опухолевые клетки, включая связывание ростовых факторов

или ингибирование ангиогенеза). Ко второй группе механизмов относят эффекты модулирования функций иммунной системы (например, активации системы комплемента Т-клеточной регуляции). Помимо этого, использование антител к определенным мишеням на поверхности опухолевых клеток зачастую является наиболее оптимальным способом селективной доставки специфического лекарственного препарата напрямую к опухолевым клеткам (за счет химической конъюгации мАт с известным цитотоксическим лекарственным препаратом).

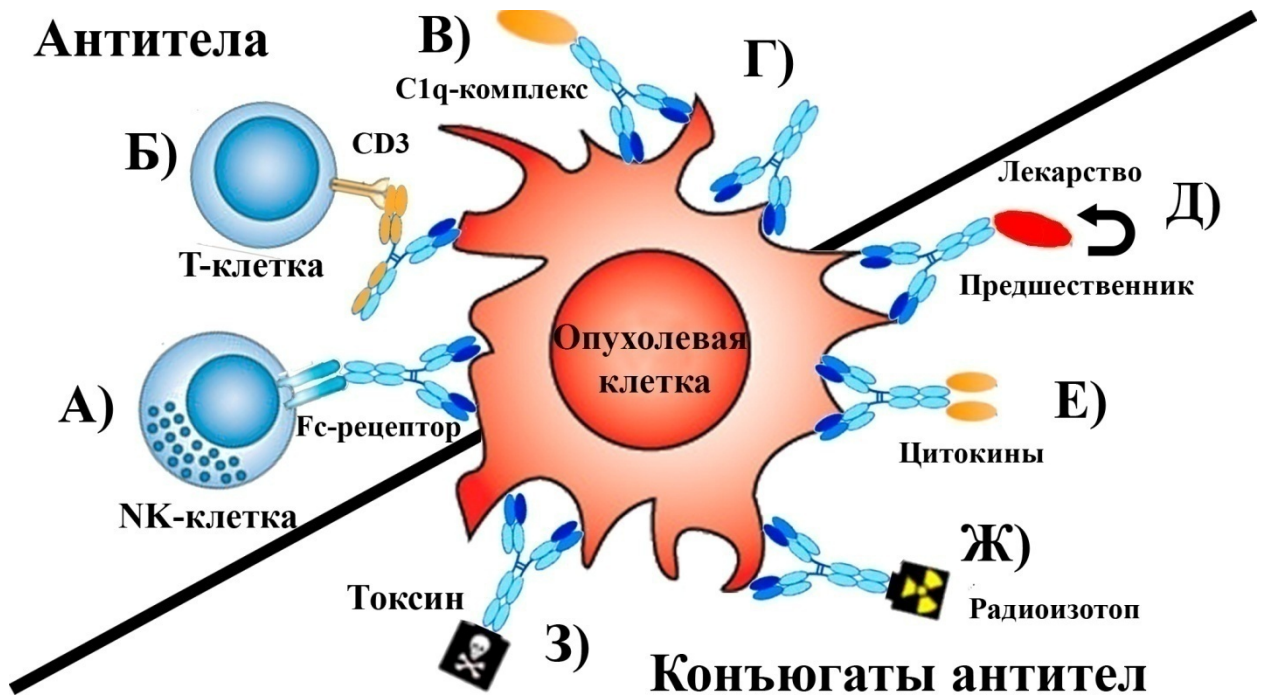


Рисунок 5. Основные механизмы действия противоопухолевых мАт и их производных: А) Рекрутирование эффекторных клеток (*ipilimumab*, *anti-CTLA-4* мАт); Б) ADCC (*rituximab*, *anti-CD20* мАт); В) CDC (*rituximab*, *anti-CD20* мАт); Г) Ингибирование клеточного роста (*panitumumab*, *anti-EGFR* мАт); Д) ADEPT (химерный TNT-3/бета-глюкуронидаза человека фьюжн белок); Е) Иммуноцитокин (*Hu14.18-IL2*, *anti-GD2* мАт) Ж) Радиоммунотерапия (*Tositumomab*, *anti-CD20* мАт); З) Иммунотоксин (*BL22*, *anti-CD22* мАт). На основе [48].

В последние годы идет активная разработка различных производных моноклональных антител с целью усиления терапевтической активности исходных мАт и/или устранения их побочных эффектов. К таким производным относятся конъюгаты антител с лекарственными препаратами (ADC), биспецифические антитела, модифицированные рекомбинантные антитела, а также фрагменты антител и/или их домены. Огромное разнообразие подходов наблюдается как в способах получения и модификаций, так и в выборе мишеней и механизмов действия данных препаратов.

Механизмы действия противоопухолевых антител, опосредуемые иммунной системой

Основными иммунными механизмами действия мАт считаются антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). ADCC является механизмом цитолиза клетки, мембранные мишени которой связаны специфичными моноклональными антителами, за счет рекрутирования клеток, несущих Fc-рецепторы (натуральных киллеров, макрофагов и нейтрофилов) при иммунном ответе, в то время как активация механизмов CDC приводит к ликвидации клеток через систему комплемента. И тот и другой тип опосредованы Fc-фрагментом антител и лучше всего проявляются в случае IgG1 изотипа антител.

ADCC включается в случае связывания поверхностного антигена опухолевой клетки с антителом. Свободный Fc-фрагмент, взаимодействуя с Fc γ -рецептором на поверхности клеток эффекторов иммунной системы, вовлекает их в реакцию иммунного ответа. Несколько семейств Fc-рецепторов были описаны и охарактеризованы для различных популяций иммунных клеток. Семейство Fc γ R человека содержит шесть известных рецепторов, разделенных на три подгруппы, включая Fc γ RI (CD64) Fc γ RIIa,b,c (CD32a,b,c) и Fc γ RIIIa,b (CD16a,b), экспрессируемых на разных эффекторных клетках иммунной системы, включая макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки и натуральные киллеры [49].

Нейтрофилы, как правило, экспрессируют Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) и В (липид-заякоренную) изоформу Fc γ RIII (CD16). В то время как натуральные киллеры экспрессируют только А (трансмембранную) изоформу CD16. Такая структура способствует рекрутированию адапторных белков и активации клеток антителами через связывание CD16. IL-2 активированные натуральные киллеры способны убивать порядка 3-4 клеток за 16 часов [50].

ADCC является механизмом быстрой индукции разрушения опухоли, что ведет к презентации антигенов В-клеткам и индукции Т-клеточного ответа. Схема развития ADCC представлена на Рисунке 6. мАт связывают антиген на поверхности опухолевой клетки, при этом оставшийся несвязанным Fc-фрагмент направлен на взаимодействие с Fc-рецептором НК-клетки (рис. 6а). Кросс-сшивка рецептора приводит к образованию иммунологического синапса, выбросу перфорина и гранзимов, которые лизируют опухолевую клетку. Клеточный дебрис поглощается антиген-презентирующими клетками (рис. 6б), которые презентуют антигены В-клеткам, тем самым включая продукцию антител и цитотоксическим Т-лимфоцитам (CTL), которые будут ликвидировать все клетки, несущие данные антигены (рис. 4с и 4d, соответственно) [51].

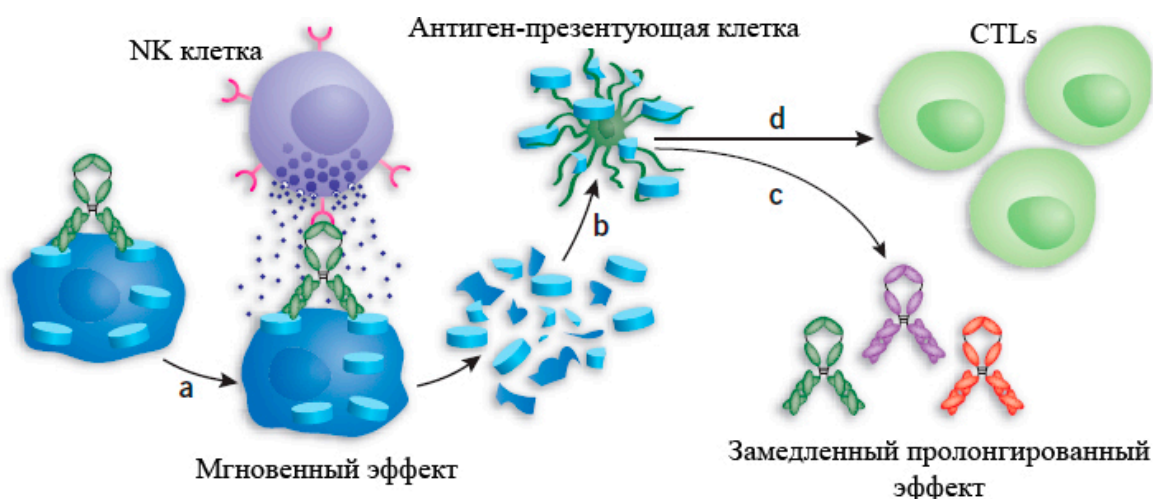


Рисунок 6. Схема развития ADCC. [51]

К сожалению, активация ADCC терапевтическими антителами имеет ряд ограничений. Прежде всего, аффинность Fc-фрагментов с его рецепторами является критическим моментом активации, а более 80% клеток экспрессируют низкоаффинный вариант рецептора. Во-вторых, способность антител индуцировать ADCC определяется олигосахаридным компонентом антитела. IgG1 гликозилированы по CH2 положению (Asn 297) Fc-фрагмента. Эта модификация крайне важна, потому что она влияет на связывание Fc фрагмента, и соответственно на эффективность действия антител. Присутствие остатка фукозы понижает эффективность ADCC [52]. Однако антитела с дефукозилированными олигосахаридами способны увеличивать ADCC как *in vitro*, так и *in vivo* [53]. Помимо этого, природа углеводородной группы зависит от того, в какой клеточной линии экспрессируются антитела. К примеру, анти-CD20 химерные IgG1, продуцируемые крысиной гибридомой YB2/0, показывают более чем пятидесятикратную активность ADCC, используя РВМС в качестве эффекторов, чем то же самое антитело, продуцируемое в CHO клеточной линии. Различия связаны с повышенной экспрессией FUT8, гена кодирующего 1,6-фукозилтрансферазу в клетках CHO. Третьим ограничением является то, что терапевтические антитела конкурируют с высокими концентрациями собственных IgG за связь с FcγRIIIa. Концентрация собственных иммуноглобулинов в сыворотке составляет 8-17 мг/мл, и более 66% этих молекул – IgG1, которые способны связываться с FcγRIIIa. Именно с этим связан тот факт, что терапевтические антитела вводятся в огромных количествах, порядка 10-100 мг/мл, в то время как *in vitro* эти антитела приводят к активной ADCC в концентрациях 10 нг/мл в отсутствии конкурирующих IgG [54].

CDC — другой механизм, запускаемый антителами, результатом которого, так же является клеточная гибель. Как и в случае ADCC, различные классы антител с разной эффективностью запускают данный тип ответа. Наилучшими эффекторами являются IgM, но из-за своего размера они практически не применяются в клинике (не попадают в ткани из

кровеносного русла). IgG1 и IgG3 достаточно эффективно индуцируют CDC через классический путь активации комплемента. В этом каскаде после связывания антигена антителом запускается активация многоэтапной системы комплемента. Процесс включает в себя несколько стадий: инициацию, образование C3-конвертазы, образование C5 конвертаз (C3a и C5a являются хемотаксическими активирующими компонентами системы комплемента) и атаку клеточной мембраны за счет присоединения C6, C7, C8 и полимеризации белка C9, который в 1000 раз повышает литическую активность комплекса белков комплемента за счет формирования в мембране пор диаметром 100 А, через которые осуществляется свободный ток воды и ионов (Рисунок 7). Сама способность мАт активировать CDC зависит от ряда факторов, включая число молекул антигена на поверхности клетки [51].

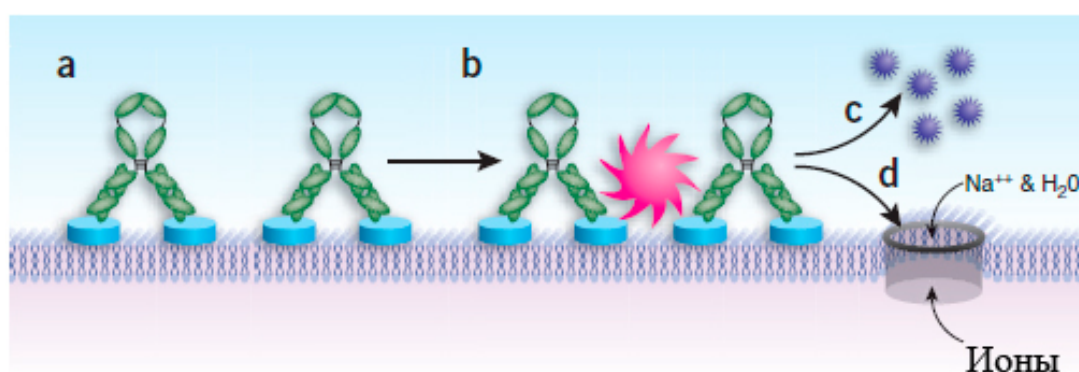


Рисунок 7. Схема развития CDC: связывание антитела (a) экспонирует сайты связывания, что запускает каскад реакций комплемента (b), и включает хемотаксические факторы (c) с образованием мембраноатакующего комплекса (d). [51]

Перечисленные выше иммунные механизмы мАт считаются основными в противоопухолевом действии препаратов на их основе. Fc-фрагмент антител, опосредующий данные механизмы, в то же время является причиной ряда побочных эффектов, которые зачастую ограничивают применение терапии с использованием мАт.

Примеры антител, успешно применяемых в клинической практике

В США начиная с 1997 года более 20 препаратов моноклональных антител были одобрены FDA для лечения различных онкологических заболеваний. Большинство препаратов моноклональных антител имеют значительно меньшую токсичность по сравнению с конвенциональными химиотерапевтическими препаратами [55]. Разрешение FDA для клинического применения препаратов мАт требует подтверждения преимуществ разрабатываемого препарата по ряду показателей по сравнению со стандартными методами терапии в ходе масштабной III фазы клинических испытаний. Однако, возможны исключения. После получения достаточно обнадеживающих результатов в рамках II фазы клинических

испытаний, bevacizumab был разрешен к применению в клинической практике для терапии глиобластом [56].

Rituximab, химерные антитела к CD20, стал одним из наиболее успешных препаратов в клинической онкологии, он наиболее эффективен в случае лимфом и хронического лимфоцитарного лейкоза. Его успешно применяют как в качестве монопрепарата, так и в комбинации со стандартными химиотерапевтическими агентами при лечении пациентов с неходжкинскими В-клеточными лимфомами и хроническим лимфолейкозом [57].

Вторым по значимости моноклональным антителом с высокой доказанной эффективностью в клинике является trastuzumab, препарат гуманизированных HER2-специфичных антител. Как и rituximab, данный препарат эффективен в качестве индивидуального противоопухолевого агента, однако, как правило, он используется в сочетании с химиотерапией у пациентов с HER2-позитивным раком груди [58].

Другим препаратом гуманизированных моноклональных антител является VEGF-специфичные mAb bevacizumab. Данный препарат как правило применяется для борьбы с солидными опухолями, так как он направлен на фактор роста эндотелия сосудов, который является лигандом рецепторов, найденных в кровеносных сосудах. Поскольку этот рецептор локализован на эндотелиальных клетках, bevacizumab эффективно снижает кровообращение опухолевых новообразований, тем самым значительно затормаживая их рост. Изначально он был одобрен для лечения колоректального рака, однако в настоящее время он широко применяется в терапии различных солидных опухолей, включая рак легких, почек и груди [57].

Побочные эффекты препаратов на основе mAb

Несмотря на то, что иммунотерапия при помощи моноклональных антител является одним из наименее токсичных методов, используемых в лечении рака, многие препараты mAb обладают рядом существенных побочных эффектов и ограничений. Размер таких антител составляет порядка 150 кДа, что делает их непригодными для внутриклеточного нацеливания и проникновения вглубь тканей. Помимо этого, активирующий Fc-домен может также быть причиной нежелательных побочных эффектов, связанных с активацией механизмов иммунной системы, а перекрестное связывание с клетками, экспрессирующими Fc-рецепторы, может привести к эффекту агониста. К ним относятся различные иммунные реакции, включая IgE-опосредованную острую анафилактическую и анафилактоидную реакции, сывороточную болезнь, синдром лизиса опухоли и синдром выброса цитокинов ("цитокиновый шторм"), синдром системного воспалительного ответа, иммуносупрессию с развитием инфекционных заболеваний (например, латентного туберкулеза), некоторые тромбоцитарные и тромбоцитические расстройства (например, тромбоцитопению), аутоиммунные заболевания,

дерматиты (в частности, сухость кожи, зуд и эритему). Некоторые терапевтические мАт могут обладать кардиотоксичностью и рядом специфических побочных эффектов [59]. Активация Fc-домена также может способствовать агрегации тромбоцитов. Длительное время жизни антител также не желательно в некоторых случаях, например для визуализации опухолей [60, 61].

Моноклональные антитела, как правило, хорошо переносятся пациентами, даже несмотря на то, что некоторые области химерных/гуманизированных препаратов антител могут распознаваться иммунной системой. Клинические проявления острых реакций, таких как сывороточная болезнь или IgE-опосредованная анафилактоидная реакция на мАт, могут сильно варьировать от локальных кожных реакций в месте инъекции, лихорадки и гриппоподобного синдрома, до острой анафилаксии и синдрома системного воспалительного ответа, которые могут иметь фатальные последствия. Развитие инфекционных заболеваний является хорошо описанным побочным эффектом некоторых моноклональных антител, что является отражением иммунодефицита, связанного с удалением мишени для моноклональных антител (например, терапия, направленная на связывание провоспалительного цитокина TNF α).

Медикаментозная иммунная тромбоцитопения может быть вызвана многими лекарственными препаратами, в том числе моноклональными антителами. Она может быть вызвана такими препаратами мАт как Infliximab (мАт к TNF α), Efalizumab (мАт к CD11) и Rituximab (мАт к CD20), однако механизмы данного процесса остаются не выясненными. Помимо этого, мАт обладают иммуномодулирующим действием, включая иммуносупрессорное, что может вызывать развитие различных аутоиммунных заболеваний, включая волчаночный синдром и волчанку, заболевания щитовидной железы, аутоиммунный колит.

В последнее время активно развиваются способы снижения побочных эффектов, включая модуляцию эффекторных функций антител, а также путем подбора оптимальной комбинаторной терапии.

2.1.3 Разработка и использование GD2-специфичных антител в противоопухолевой терапии

Имеющиеся антитела к GD2 и способы их получения

За последние два десятилетия для клинического использования было разработано не очень много типов GD2-специфичных антител. Основной проблемой в создании эффективных препаратов для иммунотерапии GD2-позитивных опухолей является получение антител, обладающих высокой аффинностью и специфичностью к ганглиозиду GD2. Иммунный ответ на гликофинголипиды, в частности ганглиозиды, как правило, приводит к образованию низкоаффинных антител класса IgM, которые в силу своего большого размера не представляют интереса при создании терапевтического препарата. Кроме того, специфичность получаемых антител также является низкой, поскольку имеется сильная структурная гомология между различными ганглиозидами, вследствие чего наблюдается значительная кроссреактивность GD2-специфичных антител.

По этим причинам в настоящее время существует только два типа GD2-специфичных антител, удовлетворяющих условиям высокой аффинности и строгой специфичности, это антитела класса IgG 3F8 и 14G2a. Ряд химерных и гуманизированных антител на их основе, в частности hu3F8, ch14.18 и hu14.18, а также некоторые их производные в настоящее время проходят клинические испытания:

Таблица 2. Некоторые терапевтические препараты на основе GD2-специфичных мАт.

<i>Тип препарата</i>	<i>Комбинации</i>	<i>Текущий статус</i>
Моноклональные антитела 3F8	3F8 + аллогенные NK-клетки	Фаза I
	3F8 + бета-глюкан	Фаза I
	3F8	Фаза II
	3F8 + GM-CSF	Фаза II
	3F8 (высокая доза) + GM-CSF + изотретиноин	Фаза II
Моноклональные антитела hu3F8	hu3F8	Фаза I
	hu3F8 + GM-CSF	Фаза I
	hu3F8 + IL-2	Фаза I
Моноклональные антитела ch14.18	ch14.18 + GM-CSF	Фаза I
	ch14.18 + леналидомид + изотретиноин	Фаза I
	ch14.18/CHO + изотретиноин + IL-2 + G-CSF	Фаза III
Моноклональные антитела hu14.18 (K3332A)	hu14.18 (K3332A)	Фаза I

hu14.18	hu14.18 (K3332A) + GM-CSF + G-CSF	Фаза II
Комплексы антитело-цитокин	hu14.18-IL2	Фаза I
	hu14.18-IL2 + GM-CSF + изотретиноин	Фаза II
	C60C3-IL15	Доклинические испытания
	Hu3F8-IL15	Доклинические испытания
Радиоактивно-меченные антитела	¹³¹ I-3F8 + GM-CSF + bevacizumab	Доклинические испытания
	¹³¹ I-hu3F8 и 124I-hu3F8	Доклинические испытания
Биспецифичные антитела, привлекающие Т-клетки	hu3F8xhuOKT3 BsAb	Доклинические испытания
Химерные комплексы антиген-рецептор	14G2a-CAR в EBV-CTL (1 поколение)	Фаза I
	IC9-GD2 (14G2a) CAR трансдуцированные VZV специфичные Т клетки + вакцина VZV	Фаза I
	hu3F8-CAR	Доклинические испытания

Данные препараты моноклональных антител, прежде всего, были использованы в терапии детской нейробластомы, которая составляет порядка 7% всех онкологических заболеваний у детей и в 15% случаев приводит к смерти пациентов. Практически все нейробластомы гиперэкспрессируют ганглиозид GD2 на уровне 5-10 млн молекул/клетку. GD2-специфичные антитела 3F8 продемонстрировали многообещающие клинические эффекты в рамках II фазы клинических испытаний, особенно в сочетании с GM-CSF. У пациентов с нейробластомой высокой степени риска значительно увеличилась долгосрочная выживаемость, за 10 лет наблюдений было выявлено всего лишь несколько рецидивов. В случаях нейробластомы высокой степени риска показатель пятилетней выживаемости без рецидивов до использования препаратов моноклональных антител составлял 13-30%, использование GD2-специфичных антител позволило увеличить этот показатель до 56-62%, что привело к повышению уровня общей пятилетней выживаемости до 80% [62]. Острые токсические эффекты GD2-специфичных моноклональных антител включали гипертонию, боль, лихорадку и крапивницу, что вероятно было вызвано гиперактивацией системы комплемента [63, 64], хотя долгосрочные токсические эффекты проявлялись не часто у пациентов, наблюдавшихся до 20 лет [65].

При этом некоторые побочные эффекты проявлялись в связи с тем, что изначально GD2-специфичные антитела имели мышинное происхождение, были созданы по классической гибридной технологии и, следовательно, индуцировали иммунный ответ с выработкой человеческих анти-мышинных антител (НАМА), что ограничивало их применение в клинической практике.

Гибридная технология позволяет получать в ответ на иммунизацию антигеном не набор разнообразных поликлональных иммуноглобулиновых молекул, а моноклональные антитела, направленные против одного специфичного антигена [66]. Базовые технологии получения моноклональных антител были описаны в 1975 году [67], и со временем были значительным образом модифицированы. Современные подходы получения GD2-специфичных моноклональных антител включают создание гибридом, использование трансгенных животных, а также получение гуманизированных антител при помощи генно-инженерных конструкций, которые кодируют легкие и тяжелые цепи антитела.

Однако изначально, практически все GD2-специфичные моноклональные антитела, находящиеся длительное время на заключительных стадиях клинических испытаний, были мышинного происхождения. Данные ганглиозид-специфичные моноклональные антитела были получены при помощи различных методов, которые можно разделить на несколько групп, представленных в таблице:

Таблица 3. Способы получения мышинных гибридом, продуцирующих GD2-специфичные моноклональные антитела.

Название и тип антитела:	Способ иммунизации:
Иммунизация опухолевыми клетками, несущими на поверхности мембранные ганглиозиды:	
Мышиное моноклональное антитело 3F8, IgG3. [68]	Мышей линии BALB/c иммунизировали инъекциями 5-10 миллионов клеток человеческой нейробластомы и перорально вводили 5-10 миллионов объединённых человеческих мононуклеаров из периферической крови каждый месяц в течение полугода. Через два месяца после последней иммунизации мышам внутривенно вводили 5 миллионов клеток человеческой нейробластомы. Через три дня после последней иммунизации было произведено выделение спленоцитов для слияния с миеломой SP/2-0. Ag14. по методу Леви. Селекция проводилась на ГАТ среде. Супернатанты полученных гибридом проверяли через 7 и 14 дней после слияния.
Мышиные моноклональные антитела ME 361, IgG2a. [84]	Для иммунизации лабораторных животных были использованы клетки линии метастатической меланомы SK MEL 23. Иммунизацию мышей линии BALB/c проводили внутривенно, инъекциями в 30 миллионов клеток SK MEL 23, с последующим введением 2 миллионов клеток через 4 недели. Через три дня после последней иммунизации было произведено выделение

	спленоцитов для слияния с 653 вариантом мышинной миеломы P3X63 Ag8. Полученные гибридомы отбирались методом лимитирующих разведений.
Мышьиные моноклональные антитела 10B8, 60C3, IgG. [69]	Мышей возрастом 6-8 недель (Balb/c или A/J) иммунизировали внутрибрюшинно в течение 4 недель. Каждую неделю лабораторным животным вводили 5 миллионов клеток EL-4 или LAN-1. Через две недели после четвертой иммунизации было дополнительно введено 5 миллионов клеток. Спленоциты выделяли через три дня после последней иммунизации. Слияние производили с клетками миеломы SP2/0-AgI4 или P3/X63-Ag8 в полиэтиленгликоле.
Мышиное моноклональное антитело 14.18, IgG3. [70]	Мышей линии Balb/c иммунизировали внутрибрюшинной 5 миллионами клеток линии человеческой нейробластомы LAN-1 один раз в неделю на протяжении 4 недель. Через три дня после последней иммунизации, выделенные спленоциты сливали с M-5 вариантом несекретирующей линии миеломы SP2/0.
Иммунизация при помощи <i>Salmonella Minnesota</i> , на мембране которых адгезировались молекулы ганглиозидов:	
Мышьиные моноклональные антитела D11G10, IgG3, 2D4, IgM. [71]	40 мкг лактона ганглиозида было растворено в дистиллированной воде, озвучено и смешано с 1 мг <i>Salmonella Minnesota</i> . Суспензию инкубировали 10 минут при 37 °С и лиофилизировали. Лиофилизат разводили в 4 мл PBS, затем, аликвота объемом 200 мкл, содержащая 2 мкг лактона на 50 мкг бактерий была введена мышам линии Balb/c внутривенно. Процедура повторялась раз в неделю в течение 3 недель. Через три дня после последней иммунизации спленоциты были слиты с клетками миеломы SP2.

Как видно из таблицы, получение гибридом, продуцирующих GD2-специфичные антитела сопряжено с иммунизацией либо смесью антигенов, либо сложным производным ганглиозида. Оба подхода имеют серьезные ограничения, вызванные либо сложностью отбора клона, продуцирующего специфичные к антигену антитела, либо со сложным синтезом значительного количества иммуногенного производного ганглиозида. Последний момент особенно критичен и сложно достижим в случае ганглиозида GD2, синтез которого является сложным и дорогостоящим. С другой стороны, широко известен факт, что иммуногенность пептидов значительно выше, чем у гликофинголипидов. В научной литературе представлены данные о ганглиозид-мимикрирующих пептидах, в том числе о GD2-мимикрирующих пептидах. Структура данных пептидов, наиболее схожих по пространственной структуре с углеводными детерминантами ганглиозида GD2, основана на феномене молекулярной мимикрии. Подход, заключающийся в использовании GD2-мимикрирующих пептидов для индукции иммунного

ответа на ганглиозид GD2, может облегчить получение гибридомы, продуцирующей специфичные антитела к ганглиозиду GD2. Кроме того, существует проблема в получении специфичных антител к ряду других ганглиозидов, и использование ганглиозид-мимикрирующих пептидов в качестве иммуногенов может стать общим подходом для решения этого вопроса.

Альтернативные подходы к получению GD2-специфичных антител

Феномен молекулярной мимикрии и GD2-мимикрирующие пептиды

В основе феномена молекулярной мимикрии лежит функциональная и пространственная схожесть между химически различными молекулами, например, способность пептидного производного и оригинального антигена, в частности, небелковой природы, связываться с определенной молекулой-мишенью [72]. Результаты многочисленных экспериментов выявили тот факт, что некоторые пептиды могут служить углеводными миметиками, ингибиторами взаимодействия белков и углеводов, а также – иммуногенами. Такие пептиды могут быть выделены из фаговых пептидных библиотек, синтетических библиотек, сконструированных методами комбинаторной химии или при помощи методов рационального дизайна [73].

Пептидные миметики способны связываться с рецепторами, в частности, с антителами, ферментами или лектинами. Подобная активность может быть определена классическими методами иммуноферментного анализа или вестерн-блота. Дополнительные конкурентные тесты на связывание между пептидами-миметиками и природными лигандами позволяют определить точную локализацию антиген-связывающего сайта. В последующих исследованиях устанавливают, какие именно аминокислотные остатки являются критичными для связывания, производят замены, укорачивают или удлиняют пептиды-миметики с целью оптимизации характеристик связывания. Структуры свободных и рецептор-связанных миметиков могут быть сопоставлены как экспериментально, так и с применением методов молекулярного докинга [74].

В последние годы интенсивно изучается природа пептидо-углеводной мимикрии. Структурная мимикрия на молекулярном уровне является оптимальной в том случае, если пептиды могут воспроизвести трехмерные взаимодействия углевода с целевым сайтом связывания. Такие контакты опосредуются благодаря определенному расположению функциональных групп. При этом, условие взаимодействия с сайтом связывания не требует от подобного пептида строго иметь точно такую же трехмерную конфигурацию, как и у мимикрируемого углевода. Наоборот, такие свойства, как подвижность или гибкость полипептидной цепи могут быть усилены. Другой тип взаимодействий, так называемая

функциональная мимикрия, происходит, когда пептид не взаимодействует с сайтом связывания мишени тем же путем, как и мимикрируемый углевод. В таком случае, пептид связывается с другим набором остатков в связывающем сайте мишени, либо же пептид может образовывать контакты с другим сайтом связывания, отличным от углеводного. Основываясь на многочисленных опубликованных данных, можно сделать вывод о том, что не существует какого-то константного или предпочтительного механизма пептидной мимикрии углеводов, кроме того, описаны примеры смешанных типов связывания [75].

Иммунологическая мимикрия является предпочтительной, если использование оригинального антигена в составе вакцины затруднено в силу различных причин. Иммунологически функциональные миметики (мимотопы), индуцируют образование антител, которые способны кросс-реагировать с природным антигеном. Мимотопы могут быть особенно полезны в том случае, когда природный антиген неизвестен, труден в очистке или синтезе, либо же является слабым иммуногеном [76]. В целом, это касается большого числа углеводов, так как точный синтез с воспроизведением хиральности зачастую является трудоёмкой и дорогостоящей задачей. Однако зачастую наблюдаются некоторые расхождения между антигенностью и иммуногенностью мимикрирующих пептидов [77]. Множество антигенных пептидов, выделенных при помощи антител, не иммуногенны в силу того, что они не связывают тот же самый паратоп, соответствующий природному эпитопу. Известно, что биологически функциональная мимикрия может быть нарушена, например, изменением последовательности, подвижности свободных пептидов, фаговым окружением, конъюгацией с белком-носителем, экспрессией в составе белка и проч.

Разнообразие свойств пептидов способствует их использованию вместо углеводов. Методология их синтеза и очистки хорошо разработана и может быть автоматизирована. Помимо этого, пептидная последовательность может быть легко модифицирована с целью замедления процессов деградации *in vivo*. Несмотря на то, что пептиды в целом являются высокоподвижными и достаточно гибкими молекулами, существуют подходы к укреплению их конформации путем введения дополнительных конструкций в основную структуру, или их экспрессии в составе более крупного белка. Пептиды являются тимус-зависимым антигенами и представляют более привлекательную альтернативу слабо иммуногенным углеводам. Молекулярная мимикрия лежит в основе новых подходов практического использования анти-идиотипических антител и пептидных миметиков, выделенных из фаговых библиотек, для индукции иммунного ответа к различным антигенам, в том числе к ганглиозиду GD2.

Пептиды, экспрессированные на бактериофагах, плаزمидях, полисомах, являются практически неисчерпаемым ресурсом для разработки новых пептидных лигандов. Примеры

пептидов, мимикрирующих ганглиозид GD2, а также антитела, использованные для их идентификации, представлены в таблице:

Таблица 4. Примеры мимикрирующих пептидов, выделенных при помощи GD2-специфичных антител.

<i>Тип антитела</i>	<i>Обозначение GD2-мимикрирующих пептидов</i>	<i>Последовательность аминокислот</i>
ME36.1	P9	LDVVLAWRDGLSGAS
	P10	GVVWRYTAPVHLGDG
	P10s	WRYTAPVHLGDG
14.G2a	47	EDPSHSLGLDVALFM
	47-LDA	EDPSHSLGLDAALFM
	94	RCNPNMEPPRCF
	94-12-F/W-AAEGD	RCNPNMEPPRCWAAEGD

Qiu с соавторами применили библиотеки, созданные при помощи вектора fUSE5, для скрининга GD2-мимикрирующих пептидов. Авторы выбрали из данной библиотеки 16 пептидов при помощи GD2-специфичных антител ME36.1 [78]. Анализ изолированных пептидов показал наличие в основном уникальных последовательностей, отражающий факт, что большое количество пептидов может мимикрировать связывание ганглиозида GD2 с антителами ME36.1. Следует отметить, что наблюдались некоторые сходства между пептидами, изолированными при помощи антител ME36.1 и BR55-2 (связывающих опухолевый маркер Lewis-Y). В частности, наличие последовательностей WRY и AP в пептиде P10 (GVVWRYTAPVHLGDG) и WRDG в пептиде P9 (LDVVLAWRDGLSGAS), которые схожи с последовательностью YRGD, обнаруженной в пептидах, изолированных при помощи BR55-2, что говорит о возможной колокализации GD2 и Lewis-Y на мембране опухолевых клеток.

Использование пептида P10 в качестве иммуногена совместно с адьювантом QS-21 привело к выработке иммунного ответа у мышей с образованием антител класса IgM, способных связывать ряд ганглиозидов, включая GD1b, GD1a, GD3, GD2 и GM2. При помощи методов молекулярного моделирования было показано, что P10 связывается с антителами ME36.1 при помощи всего лишь двух водородных связей — Tyr33 и Ser100 тяжелой цепи. В то время как ганглиозид GD2 связывается антителами значительно эффективнее, взаимодействуя с Tyr33, His35, Asp50, Asn52, Asn59, Ser100 тяжелой цепи, и Tyr93 легкой цепи. Для усиления иммунологической мимикрии ганглиозида GD2, был разработан укороченный пептид P10s, который значительно эффективнее связывается с антителами ME36.1. Показано взаимодействие с Tyr33, Asp50, Asn59, Ser100 тяжелой цепи, и Tyr93 легкой цепи. Иммунизация пептидом P10s

индуцировала иммунный ответ с образованием антител класса IgM, которые эффективно связывали ганглиозид GD2, и значительно менее эффективно ганглиозиды GD3 и GM2. Помимо этого, на ряде опухолевых клеточных линий было показано связывание мембраносвязанного ганглиозида GD2 [79].

Таким образом, мимикрирующие пептиды и анти-идиотипические антитела могут функционально воспроизводить углеводы, включая ганглиозид GD2. Более того, эти искусственные антигены часто индуцируют гуморальный и клеточный иммунные ответы, которые углеводные антигены сами по себе не в состоянии запустить. Использование данного подхода наиболее оправдано в разработке противоопухолевых вакцин, а также является обоснованным инструментом для получения новых, высокоэффективных GD2-специфичных антител.

Клинические исследования антител к GD2, положительные и побочные эффекты

Мышиные GD2-специфичные антитела

Первыми GD2-специфичными моноклональными антителами, протестированными на пациентах с нейробластомой, были мышиные антитела 3F8. Они относятся к IgG3 классу мышиных моноклональных антител и обладают самой высокой аффинностью к ганглиозиду GD2 из известных антител ($KD = 5 \text{ нМ}$) [80]. Считается, что механизм уничтожения опухолевых клеток антителами 3F8 опосредуется человеческим комплементом и различными человеческими иммунными эффекторными клетками, включая лимфоциты, гранулоциты и моноциты [81]. 3F8 связывается с Fc γ RII и Fc γ RIII, обеспечивая нейтрофил- и NK-зависимую антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность.

В I фазе тестирования 3F8 были оценены дозы 5, 20, 50 и 100 мг/м², применяемые каждые 8 часов в течение 2-4 дней. Гипертензия ограничивалась дозой 100 мг/м². Другие токсические эффекты, наблюдаемые при применении 3F8, включали сильную боль, жар и крапивницу. Фармакокинетический анализ показал, что значение сывороточной концентрации 3F8 повышается с повышением применяемой дозы. У двух из восьми пациентов с нейробластомой проявился полный ответ, а у 2 из 9 пациентов с меланомой ответ был частичным. У всех протестированных пациентов вырабатывались человеческие антитела против мыши (НАМА) к 3F8. Те пациенты, у которых уровни НАМА > 1000 U/мл, имели достаточно сильные побочные эффекты и не получали терапевтического преимущества от 3F8. Во II фазе испытания 3F8 16 пациентов с нейробластомой высокой степени риска получали дозу 10 мг/м² антител ежедневно в течение 5 дней. Среди наблюдаемых токсических эффектов были боль, жар, крапивница, гипертензия, гипотензия и анафилактические реакции. Только у одного из 13 пациентов наблюдался полный ответ. Исследования были продолжены, в полной группе из 34 пациентов

были получены доказательства наличия ответа иммуноцитологическим методом у 6 из 9 пациентов, методом RT-PCR GAGE у 7 из 12, методом иммуносцинтиграфии у 6 из 6 пациентов.

В комбинации с цитокином GM-CSF 3F8 индуцировали полный ответ в 80% случаев при химиорезистентной нейробластоме с метастазами в костном мозге, и более чем в 60% случаев наблюдалась долгосрочная выживаемость среди пациентов группы высокого риска (4 стадия метастатической нейробластомы после первой ремиссии). Для того, чтобы сократить перечисленные выше токсические эффекты, которые ограничивают максимально переносимую дозу, была выработана новая стратегия терапии с использованием термически-обработанных антител 3F8, которые не обладают эффекторными функциями, однако могут служить в качестве блокирующего агента для чувствительных периферических нервов до введения терапевтических доз 3F8. Исследования Фазы I показали, что такой подход значительно снижает анальгетические требования по сравнению с контролем для дозы 80 мг/м²/день [82].

Два других хорошо описанных мышинных GD2-специфичных моноклональных антитела, ME361 и 14G2a имеют более низкую аффинность к GD2 по сравнению с 3F8 (KD = 19 нМ и KD = 77 нМ соответственно).

Моноклональные антитела 14G2a относятся к IgG2a классу антител, и являются вариантом антител 14.18, которые были первоначально получены с изотипом IgG3. Антитела 14G2a проявили повышенную ADCC по сравнению с антителами 14.18 как *in vitro*, так и *in vivo*.

I фаза испытаний моноклональных антител 14G2a была проведена с участием 18 пациентов с невосприимчивой меланомой, остеосаркомой или нейробластомой. мАТ 14G2a вводились в виде 120-часовой непрерывной внутривенной инъекции. Токсичность, ограничивающая дозу введения наблюдалась при режиме 40 мг/м²/день в течение 5 дней. Побочные эффекты включали диарею, гипотензию и аллергические реакции (жар, сыпь, одышка и гипоксия). Острая боль была основным побочным эффектом у всех пациентов. У двух пациентов развилась медленно обратимая гипонатриемия (пониженная концентрация натрия в плазме крови) и ортостатическая артериальная гипотензия (неспособность сосудов поддерживать артериальное давление). В этом исследовании других неврологических отклонений описано не было. Максимальная допустимая доза составила 20 мг/м²/день в течение 5 дней. Наблюдалось 2 частичных ответа (оба с нейробластомой) и 3 смешанных ответа (2 с меланомой и 1 с остеосаркомой). Последующие исследования показали, что применение 14G2a в сочетании с IL-2, позволяет незначительно улучшить эффективность данных антител [83].

Фармакокинетика 14G2a оценивалась в педиатрических и взрослых клинических исследованиях. Было установлено, что очистка плазмы от 14G2a происходит в два этапа и зависит от дозы с более коротким периодом β полувыведения у педиатрических пациентов по

сравнению со взрослыми пациентами, $18,3 \pm 11,8$ часов против 62 ± 20 часов, соответственно. У пациентов, прошедших второй курс терапии антителами, наблюдалось существенное снижение конечного времени полувыведения антител.

Несмотря на то, что применение 14G2a, приводит к ощутимым противоопухолевым эффектам, их использование ограничивается существенным недостатком этих и других мышинных моноклональных антител, выражающимся в развитии титров НАМА, приводящих к реакциям гиперчувствительности замедленного типа.

Изначально мышинные моноклональные антитела ME36.1 относились к классу IgG3, но затем были получены IgG2a и IgG1 варианты [84]. ME36.1 связываются преимущественно с GD2, однако наблюдается слабая перекрестная реактивность с ганглиозидом GD3, который также представлен на ряде опухолей нейроэктодермального происхождения, включая меланому. Доклинические исследования показали, что антитела ME36.1 (IgG2a) способны значительно ингибировать рост опухоли в месте введения, а также останавливать распространение метастазов в лимфатические узлы и легкие. Была получена кристаллическая структура Fab-фрагмента антитела ME36.1 для гуманизирования данного антитела, однако данная процедура снизила связывающую способность [85].

Ряд указанных проблем использования мышинных антител в клинике, а также новые успехи в генной инженерии побудили ученых к созданию химерных GD2-специфичных антител.

Рекомбинантные GD2-специфичные антитела

В связи с заметными побочными эффектами использования мышинных антител практически сразу начались разработки по созданию химерных, гуманизированных или полностью человеческих GD2-специфичных моноклональных антител.

Моноклональные антитела 14G2a были химеризованы с получением ch14.18 и гуманизированы с получением hu14.18. Ch14.18 антитела состоят из Fab-фрагмента мышинового 14G2a антитела, который объединен с человеческим константным Fc-регионом иммуноглобулина IgG1. Это антитело сохраняет специфичность к ганглиозиду GD2 и способность нацеливаться на GD2-позитивные опухоли. Ch14.18 опосредует опухолевую ADCC *in vitro* в 50-100 раз более эффективно, чем мышинное антитело 14G2a.

Клинические испытания ch14.18 в качестве единственного терапевтического агента представлены в таблице:

Таблица 5. Клинические испытания GD2-специфичных антител ch14.18.

Дизайн испытания	Тип заболевания (число пациентов)	Доза и график	Максимальная допустимая доза (MTD)	Токсичность	Ответ
Фаза I	Меланома (13)	5-100 мг×1-2 дня	50 мг (ежедневно×2 дня)	Боль	Нет
Фаза I	Нейробластома (9)	20-50 мг/м ² /доза каждые 8 часов ежедневно×5 дней	50	Боль (дозо- ограничивающая токсичность), зуд, жар, крапивница, экзантема (кожная сыпь)	2 полный ответ 2 частичный ответ
Фаза I	Нейробластома (10) Остеосаркома (1)	10-200 мг/м ² каждые 1-4 дня каждые 2-3 недели (MTD не достигалась)	Не установлена	Боль (наиболее общий), жар, гипертензия, крапивница, сывороточная болезнь и тахикардия	1 полный ответ 4 смешанных ответа

Фаза I тестирования ch14.18 была впервые проведена на 13 взрослых пациентах с метастатической меланомой. Ch14.18 применялись либо в виде однократной дозы от 5 мг до 45 мг (внутривенно каждые 4 часа), либо ежедневно в виде двукратной дозы по 50 мг каждая (100 мг общая суточная доза). Доза 50 мг была выбрана как максимальная ежедневная доза, поскольку боли в области брюшной полости и таза в течение введения антител предотвращали использование более высоких доз. Эта боль была сильной у 3 из 4 пациентов, получивших 100 мг, но также наблюдалась у пациентов, получавших 15 мг или 45 мг антител. Других побочных и сильных токсических эффектов не наблюдалось. У 8 из 13 пациентов вырабатывались антитела к ch14.18, но наблюдаемые титры составляли около 10%. Также детектировались анти-идиотипические и анти-изотипические антитела. Хотя не было выявлено противоопухолевых ответов, антитела детектировались на опухолевых клетках, что было установлено с помощью FACS анализа у некоторых пациентов, получивших ≥ 45 мг антител ch14.18.

В I фазе педиатрического испытания 9 детей (в возрасте 2-10 лет) с нейробластомой получали свыше 50 мг/м² ch14.18 в течение 5 дней. Боль в большинстве случаев была наиболее общим побочным эффектом в течение лечения и была наиболее выражена при дозе 50 мг/м². Таким образом, было установлено, что доза 50 мг/м² является максимально допустимой. Другие побочные эффекты включали жар, крапивницу, зуд и сыпь. У одного пациента развилась временная нейротоническая зрачковая реакция при применении самой высокой дозы препарата. Атрофия зрительного нерва наблюдалась у двух пациентов, оба ранее получали лучевую терапию, что повлияло на развитие нежелательных осложнений. Этот токсический эффект постепенно разрешился в течение 6 месяцев после терапии ch14.18. НАМА не детектировались ни у одного из пациентов в этом исследовании. Два пациента имели полный ответ, 2 – частичный ответ, и 1 – минорный ответ.

Фармакокинетические анализы ch14.18, проведенные в педиатрической фазе I исследования, описанного выше, показали, что площадь под кривой (AUC) для ch14.18 строго коррелирует с дозой. Более высокие дозы антител приводят к более высокому пику их сывороточной концентрации. Далее, также, как и для его мышинового аналога, 14G2a, очищение плазмы от ch14.18 происходит двухфазно, и это время существенно короче у детей, чем у взрослых. После первого курса лечения терминальное время полувыведения (t_{1/2}) альфа составляло 3,4±3,1 часов, а t_{1/2} бета – 66,6±27,4 часов. t_{1/2} бета существенно снижалось от 72,9±19,8 часов до 31,7±18,4 часа у 5 пациентов, которые прошли второй курс терапии антителами. У 3 из этих 5 пациентов также развивался существенный ответ против химерных антител, что говорит о том, что быстрое выведение антител из сыворотки может происходить частично вследствие формирования иммунных комплексов, элиминируемых в дальнейшем ретикулоэндотелиальной системой.

Недавние результаты Фазы III рандомизированных клинических исследований показали, что использование ch14.18 в сочетании с GM-CSF и IL-2, значительно повышает выживаемость пациентов с нейробластомой группы высокого риска по сравнению со стандартной терапией после двух лет наблюдения [86].

hu14.18K322A это гуманизированные GD2-специфичные моноклональные антитела, состоящие из аминокислотных последовательностей тяжелых и kappa легких цепей молекулы IgG1 человека, с включенными аминокислотными последовательностями CDR антител 14.18 мышинового происхождения. Следует отметить, что hu14.18 приблизительно на 98% включают последовательности иммуноглобулина человека, что делает данный тип антител сравнительно не иммуногенным. Помимо этого, hu14.18K322A имеет одну мутацию (K322A), которая препятствует активации системы комплемента. Данные антитела продуцируются крысиными клетками миеломы YB2/0, характеризующимися слабой фукозилирующей активностью, что

потенциально должно приводить к усиленной ADCC активности продуцируемых антител. Результаты экспериментов *in vitro* показали, что hu14.18K322A сохраняют связывающую способность и способность активировать ADCC. При этом предполагается, что данные антитела практически не вызывают комплемент-зависимый лизис клеток [87].

В рамках первой фазы клинических испытаний 38 пациентов с рецидивирующей нейробластомой (23 мужчины, средний возраст 7,2 года) прошли в среднем два курса (разброс от 1 до 15 курсов) терапии антителами hu14.18K322A. Каждый курс представлял собой введение антител от 2 до 70 мг/м²/день в течение 4-х дней, интервалы между курсами составляли 28 дней. Дозолимитирующие токсичности 3 или 4 уровня проявились у 4-х пациентов и включали кашель, астению, сенсорную нейропатию, анорексию, сывороточную болезнь и гипертоническую энцефалопатию. Наиболее часто встречающимися не дозолимитирующими побочными токсичностями являлись боль (68%) и жар (21%). У четырёх пациентов наблюдался полный ответ, у двух пациентов – частичный ответ. Терминальное время полувыведения hu14.18K322A (t_{1/2}) альфа составляло 1.74 дня, t_{1/2} бета составляло 21.1 день, что существенно выше, чем у мышинных и химерных аналогов [88].

Мышиные антитела 3F8 также были недавно гуманизированы с получением hu3F8, в данный момент они проходят клинические испытания. Первые результаты показывают низкий уровень НАМА-ответа, а также сниженные болевые побочные эффекты. Было показано, что hu3F8 в меньшей степени активирует систему комплемента по сравнению с мышинными 3F8, что подтверждает гипотезу о том, что болевые эффекты, индуцированные GD2-специфичными антителами являются комплемент-зависимыми [89].

Первыми анти-GD2 mAb полностью человеческой природы были L72, антитела IgM класса, которые были получены *in vitro* при помощи трансформированных вирусом Эпштейна-Барр лимфобластоидных клеточных линий, полученных из лимфоцитов периферической крови пациентов с меланомой. В рамках клинических исследований, где L72 непосредственно вводили в области кожных поражений у 8 пациентов, регрессия была видна во всех случаях опухолей, за исключением двух пациентов. Последующие исследования не проводились [90].

2.1.4 Современные стратегии повышения эффективности GD2-направленной терапии онкологических заболеваний

Анти-GD2 мАт показали противоопухолевую активность, как у взрослых пациентов, так и у детей с опухолями, в основном с нейробластомой и меланомой. К сожалению, быстро внедрить в клинику разработанные препараты GD2-специфичных антител не удалось. Полноразмерные мАт обладают не оптимальными фармакокинетическими свойствами и плохо проникают вглубь солидных опухолей, чужеродные мышинные мАт сравнительно быстро подвергаются катаболизму, а полноценная активация системы комплемента и запуск клеточных механизмов элиминации опухолевых клеток невозможна, вследствие слабого распознавания мышинных мАт Fc-рецепторами клеток иммунной системы, что в целом, учитывая побочные эффекты, делает использование существующих препаратов GD2-специфичных антител недостаточно эффективным. Помимо этого, известно, что микроокружение опухолей является неблагоприятной средой для клеток иммунной системы (вследствие гипоксии и оксидативного стресса в микроокружении опухолей), что снижает ADCC-эффекты полноразмерных моноклональных антител.

Оптимизация данных антител для повышения эффективности клинических препаратов на их основе – сложный процесс, который в настоящее время развивается условно в трех направлениях. Во-первых, идет активная разработка гуманизированных антител, в которых иммуногенные участки мышинных антител заменены на соответствующие фрагменты иммуноглобулина человека. Теоретически, данный подход приведет к уменьшению нежелательных иммунных реакций с образованием НАМА при одновременном усилении ожидаемых противоопухолевых эффектов. Во-вторых, развиваются генно-инженерные методы уменьшения размеров антител с сохранением антиген-связывающих доменов с их последующей модификацией. В частности, рекомбинантные scFv-фрагменты антител, которые кодируются одним геном и содержат только один антигенсвязывающий участок, являются крайне перспективными молекулами в терапии GD2-позитивных опухолей. scFv-фрагменты обладают оптимальными фармакокинетическими характеристиками для проникновения вглубь солидных опухолей, совместимы с бактериальными системами экспрессии и не обладают эффекторными свойствами, которые могут привести к нежелательным побочным эффектам. Помимо прочего, данные молекулы могут быть достаточно легко модифицированы как с получением диател, способных связывать несколько молекул ганглиозида GD2 или биспецифичных препаратов, способных взаимодействовать с несколькими опухолеассоциированными ганглиозидами, так и с получением конъюгатов с различными химиопрепаратами или радиоизотопами, что позволит значительно увеличить эффективность таких комплексов. Третье направление разработок, направленных на повышение эффективности противоопухолевой терапии, включает

доклинических испытаний IL-2 у пациентов с нейробластомой, и одобрением FDA для лечения других онкологических заболеваний, включая метастатический рак почек и злокачественную меланому.

Известно, что IL-2 способен активировать NK, NKT и CD8(+) T-клетки. Gillies с соавторами получили три формы конструкций, в которых IL-2 был слит с С-концом моноклонального антитела ch14.18 в различных вариантах: IL-2 был слит с С-концом тяжелой цепи CH1 (с получением одновалентного "Fab-IL2"), с С-концом домена CH2 ("CH2-IL2"), и, наконец, с С-концом домена CH3, с сохранением полноразмерной структуры IgG ("CH3-IL2") [94]. Все три полученные конструкции сохранили цитокиновую активность, что было показано с помощью классических методов анализа пролиферации T-клеток, однако Fab-IL2 практически полностью потерял GD2-связывающую активность. Следует отметить, что для CH3-IL2 было показано усиление связывания с гликолипидным экстрактом нейробластомы по сравнению с не модифицированным моноклональным антителом ch14.18. Помимо этого, IL-2 способен напрямую связываться с ганглиозидом [95], который экспрессируется на клетках нейробластомы, а также сенсорных нейронах, что обеспечивает таким иммуноцитокинам повышенную способность связываться с клетками опухолей, что в свою очередь улучшает параметры биораспределения и изменяет профиль токсичности. Показано, что фьюжн-белок Ch14.18-IL-2 ("CH3-IL2") успешно активирует эффекторные клетки человека и способен более эффективно подавлять ксенографты в сравнении с нативными антителами ch14.18 в сочетании с рекомбинантным IL-2.

Для снижения потенциальной иммуногенности, был разработан фьюжн-белок hu14.18-IL-2, который прошел I и II фазы клинических испытаний и показал ответ у 21% пациентов с минимальной остаточной болезнью, но не проявил себя в случае обширного опухолевого поражения и опухолей мягких тканей. Наблюдаемые побочные эффекты напоминали побочные эффекты свободного IL-2, в том числе синдром повышенной проницаемости капилляров и нарушение нормальной работы печени [96].

GM-CSF активирует гранулоциты и моноциты и при этом обладает меньшими побочными эффектами по сравнению с IL-2. К настоящему моменту получен иммуноцитокин GM-CSF-hu14.18, в котором GM-CSF пришит к С-концу тяжелой цепи hu14.18. В экспериментах *in vitro* данный белок проявил значительно более сильную ADCC по сравнению с неконъюгированными антителами или их комбинациями со свободным GM-CSF [97]. Однако дальнейшие исследования не проводились, в настоящее время фокус клинических испытаний направлен на изучение эффектов hu14.18-IL-2.

IL-15 является цитокином, который похож по своей структуре на IL-2 и способен активировать NK, NKT и CD8⁺ T-клетки. Однако, в отличие от IL-2, он не вызывает синдром

повышенной проницаемости капилляров, преципитат-активированную гибель индуцированных Т-клеток или активацию ингибирования регуляторных Т-клеток (Tregs). В связи с этим ведется активное изучение противоопухолевых свойств IL-15. IL-2 и IL-15 имеют общие для связывания β - и γ - субъединицы IL2/IL-15 рецептора, но взаимодействуют со специфичной α -субъединицей рецептора. Исследования показали, что комплекс IL-15/IL-15R α обладает повышенным иммуностимулирующим действием в сравнении с IL-15. Mortier et al. [98] отмечают что слитый белок, состоящий из sushi домена IL-15R α (остатки 1-77), связанный с IL-15, имеет повышенную функциональную активность по сравнению со свободным IL-15 или его комбинации с IL-15R α . Той же группой был получен иммуноцитокин, в котором IL-15 слитый белок был связан с химерным GD2-специфичным антителом с.60C3 к С-концу тяжелой цепи. Тесты *in vitro* показали, что данный иммуноцитокин обладает схожими параметрами ADCC и усиленными параметрами CDC в сравнении со свободными антителами с60C3. Эксперименты *in vivo* показали повышенную противоопухолевую активность в сравнении со свободными антителами или их комбинацией с цитокином. Повышенная активация системы комплемента может усиливать болевые побочные эффекты, однако, при этом немного снижается риск развития синдрома повышенной проницаемости капилляров и ряд других неблагоприятных побочных эффектов, которые ограничивают применение подобных препаратов [99].

Иммунотоксины

Ряд подходов по слиянию антител с белковыми токсинами, полученными из бактериальных и растительных источников с изученными цитотоксическими свойствами, был разработан в связи с необходимостью усиления противоопухолевой активности GD2-специфичных антител. Первые исследования в данной области проводились с использованием пришивки рицин-А цепи токсина (RA) к мышинным моноклональным антителам 14G2a [100]. Рицин является инактиватором рибосом, состоящим из А и В цепей. В связи с тем, что В цепь токсина обладает неспецифической токсичностью, для пришивки к моноклональным антителам были использованы А цепи, что привело к незначительному снижению активности токсина. Конъюгат 14G2a-RA (в молярном соотношении 1:1) показал цитотоксические эффекты *in vitro* на клеточных линиях, экспрессирующих GD2 и характеризующихся высоким уровнем эндоцитоза. Конъюгат 14G2a-гелонин показал 1000-кратное увеличение цитотоксичности *in vitro* по сравнению со свободным гелонином, а также сохранил свою способность к активации ADCC и CDC [101].

Помимо пришивки к полноразмерным IgG антителам, были получены иммунотоксины на основе GD2-специфичного scFv-фрагмента 5F11. В группе под руководством Thomas [102] получили рекомбинантный слитый белок с А-цепью дифтерийного токсина. Данный комплекс

индуцировал прямую гибель GD2-позитивных опухолевых клеток без Fc-опосредованной ADCC и CDC. Помимо этого, проводились предварительные исследования рекомбинантного scFv-фрагмента антител 14.18, слитого с экзотоксином А синегнойной палочки, который так же индуцировал прямую гибель GD2-позитивных клеток *in vitro* [103]. В то время как иммунотоксины открыли перспективы усиления гибели GD2-позитивных опухолевых клеток, основными проблемами остается их иммуногенность, а также значимое влияние иммунотоксинов на здоровые клетки организма в экспериментах *in vivo*.

Конъюгаты антител с лекарственными препаратами

Разработка конъюгатов антител с лекарственными препаратами, в которых высокоэффективные цитотоксические препараты адресно доставляются к определенным опухолевым клеткам, является областью, в которой уже успешно прошли клинические испытания и одобрены FDA 2 противоопухолевых препарата и более 20 кандидатов проходят клинические испытания. Конъюгаты антител с лекарственными препаратами состоят из трех частей: опухолеспецифичное антитело, цитотоксический препарат и соединяющий их линкер. Эффективность такого препарата зависит от правильного сочетания всех трех составляющих. Подобные соединения должны эффективно связываться с опухолевыми клетками с последующим эндоцитозом в лизосомы, где цитотоксический препарат селективно высвобождается внутрь клетки. В отличие от иммунотоксинов эффективность данных препаратов целиком зависит от пришитого к антителам цитотоксического препарата, эффективность которого, как правило, крайне высока даже в пикомолярных количествах. В настоящее время для создания таких конъюгатов используют лекарственные препараты, которые блокируют полимеризацию тубулина (ауристин и майтансин) или агенты, повреждающие ДНК (калихеамицин и дуокармицин). В литературе известен конъюгат, полученный на основе GD2-специфичных моноклональных антител 14G2a, с пришитым аналогом калихеамицина. Данный препарат значительно супрессирует метастазирование в печень в сингенной мышинной модели нейробластомы [104]. Однако вследствие экспрессии ганглиозида GD2 клетками периферических нейронов, для препаратов такого типа возможна существенная нейротоксичность.

Радиоактивно меченые антитела

Одним из первых терапевтических подходов, основанных на использовании GD2-специфичных моноклональных антител, являлось радиоактивное мечение при помощи I^{131} моноклональных антител 3F8 для радиоиммунотерапии (RIT). Клетки нейробластомы

чувствительны к воздействию радиации, и данный подход, включавший направленное воздействие радиации, обладает меньшими побочными эффектами по сравнению с внешним воздействием, особенно для детей. Доклинические испытания показали полную абляцию опухолей на модели бестимусных мышей. Максимально допустимая доза была выяснена в ходе Фазы I клинических испытаний у пациентов с нейробластомой, побочные эффекты включали боль, лихорадку, крапивницу, гипотиреоз, миелосупрессию с необходимостью пересадки костного мозга [105]. В настоящее время исследования продолжаются.

Направленные наночастицы

Использование наночастиц предоставляет возможность доставки больших количеств препаратов, включая цитотоксические и контрастные агенты, а также терапевтические РНК. Большинство наночастиц имеют размеры в пределах 3-200 нм и могут состоять из различных структур, включая полимеры, липиды, вирусы или углеродные нанотрубки.

В ряде исследований были созданы липидные наночастицы, которые представляли собой липосомы, несущие GD2-специфичные моноклональные антитела [106]. Преимуществами адресных липосомальных наночастиц являются их усиленная интернализация в опухолевые клетки [107], а также способность проникать через неплотные капилляры солидных опухолей, в то время как плотные контакты капилляров нормальных тканей ограничивают их проникающую способность. В одной из таких работ полноразмерные антитела 14G2a встраивали в мембрану липосом, несущих фенретидинпроизводное 13-цис-ретиноевой кислоты, который эффективен в терапии нейробластомы [108]. Эксперименты *in vivo* показали противоопухолевые эффекты, однако в такой системе не могут быть исключены собственные ADCC эффекты антител. По этой причине были использованы Fab-фрагменты тех же антител, которые не способны запускать ADCC. Время циркуляции таких частиц возросло, так как они хуже обнаруживались ретикулоэндотелиальной системой. GD2-специфичные Fab-фрагменты были использованы для нацеливания липосом, несущих различные препараты, включая антисмысловые олигонуклеотиды к протоонкогенам *c-myc* и *c-myc*, малые интерферирующие РНК к гену киназы анапластической лимфомы и химиопрепарат доксорубин [109]. Использование данных подходов снижает метастазирование и повышает выживаемость в мышиных моделях. Группа под руководством Adrian использовала моноклональные антитела hu14.18 для нацеливания липосом, несущих siRNA против фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A). Результаты экспериментов *in vitro* показали, что с их помощью экспрессия VEGF-A может быть селективно снижена [110].

Другие форматы наночастиц включали GD2-специфичные кремниевые наночастицы, которые могут быть стабильнее и инертнее в сравнении с липосомами и могут нести большие

объемы препаратов. Наночастицы на основе оксида кремния были связаны с моноклональными антителами ch14.18 и загружены микроРНК-34а, которая нацелена на несколько опухолеассоциированных генов, включая MYCN, BCL2, SIRT1, NOTCH1, JAG1, CCND1, CDK6 и E2F3. Исследования на мышинной ксенографтной модели показали специфическое поглощение микроРНК-34а и супрессию опухолевого роста по сравнению с контролем. Другой стратегией, предложенной Shen et al. [111], было использование наночастиц из полиэтиленгликоля и полиэтиленimina, сшитых с оксидом железа (для МРТ-исследований), направленных при помощи моноклональных антител 14G2а и нагруженных siRNA, нацеленной на ген BCL2. Эти наночастицы способны селективно выключать работу белка Bcl-2, который в нормальной ситуации ингибирует апоптоз опухолевых клеток, и за счет этого значительно снижают рост клеток нейробластомы у мышей. Помимо этого, моноклональные GD2-специфичные антитела 14G2а пришивали к углеродным нанотрубкам, и наночастицам золота. Исследования *in vitro* показали, что такие наночастицы способны активировать фототермолизис клеток нейробластомы под действием ближне-инфракрасного лазера [32]. Однако, сложность получения таких препаратов обуславливает их высокую себестоимость.

Биспецифичные антитела, рекрутирующие Т-клетки

Основанный на данных клинических испытаний антител, способных рекрутировать Т-клетки (например, blinatumomab'a - биспецифичных антител к CD19 и CD3), данный тип противоопухолевой терапии в настоящее время является областью активных исследований и разработок. Было показано, что Т-клетки могут быть успешно рекрутированы для элиминирования GD2-позитивных клеток с использованием конъюгированного - биспецифичного анти-GD2-CD3 антитела [112]. Моноспецифичные антитела 5F11 и hu3F8 были успешно использованы для получения анти-GD2-CD3 биспецифичных иммуноглобулинов. Исходя из предварительных экспериментов, биспецифичные антитела, сконструированные как на основе IgG так и scFv-фрагментов, обладают значительно более высоким противоопухолевым потенциалом в сравнении с моноспецифичными антителами.

О-ацетил-GD2-специфичные антитела

Было показано, что помимо GD2, на клетках нейробластомы и меланомы представлены молекулы 9-О-ацетил-производного ганглиозида GD2. Из панели, в которую входят 15 GD2-специфичных моноклональных антител, 13 мАт, включая 3F8, связываются как с GD2, так и с 9-О-ацетил-GD2. При помощи моноклональных антител 8B6, которые специфически связываются с 9-О-ацетил-GD2 и не взаимодействуют с GD2, показано отсутствие 9-О-ацетил-GD2 в нормальных тканях, в частности на периферических нервах (присутствие GD2 на

нормальных тканях было показано другими методами). При сравнении с 14G2a, 8B6 связывались исключительно с опухолевыми клетками, в то время как 14G2a взаимодействовали также с нормальными клетками. Высказано предположение, что нацеливание на 9-О-ацетил-GD2 позволит дополнительно снизить побочные эффекты ганглиозид-специфичных моноклональных антител. Авторы предполагают, что 8B6 способны останавливать рост опухолевых клеток *in vitro* и в мышечных моделях путем ареста клеточного цикла с запуском механизма апоптотической гибели клеток [113]. Однако, данные антитела являются химерными и требуют дополнительного гуманизирования.

Химерные рецепторы антигенов (CAR)

Альтернативным подходом к перенацеливанию Т-клеток для лизиса опухолевых клеток является использование химерных рецепторов антигенов (CAR), экспрессированных на поверхности Т-клеток для клеточной терапии. Предварительные испытания первого поколения GD2-специфичных CAR (с использованием антител 3G6 и ретровирусной трансфекцией) показали необходимость в костимулирующем сигнале. Следующие поколения CAR были разработаны группой Brenner с использованием scFv-фрагмента моноклонального антитела 14G2a в качестве внеклеточного домена, генетически слитого с трансмембранными и внутриклеточными доменами CD28, OX40 и f-цепью TCR. В исследованиях *in vitro* было показано, что такие CAR-модифицированные Т-клетки способны вырабатывать цитокины, обладают способностью к пролиферации и могут сравнительно эффективно поражать опухолевые клетки [114]. Исследования на мышечных ксенографтах показали регрессию опухолей и увеличение выживаемости, а предварительные исследования фазы I у пациентов с нейробластомой показали жизнеспособность CAR модифицированных Т-клеток и ответ у половины всех пациентов [115]. Важно отметить, что у пациентов, получавших такую терапию, не наблюдались острые побочные эффекты, которые обычно проявлялись в случае иммунотерапии полноразмерными антителами, что подтверждает тот факт, что острая боль и прочие побочные эффекты являются комплемент-зависимыми. Последние доклинические исследования показали эффективность GD2-специфичных CAR-модифицированных Т-клеток в терапии саркомы Юинга.

Все указанные выше подходы в настоящее время реализуются с использованием самых современных методов молекулярной биологии, однако в большинстве своём они находятся на ранних стадиях развития и лишь отчасти способны решить проблемы побочных эффектов и ограничений в терапии GD2-позитивных опухолей. К сожалению, комплексного подхода, который позволил бы снизить большинство побочных эффектов при сохранении высокой эффективности противоопухолевой терапии и сравнительно низкой себестоимости, пока что не

разработано. Вполне возможно, это связано с тем, что в большинстве работ опухлеассоциированный ганглиозид рассматривается исключительно как молекула-мишень. Основными механизмами действия GD2-специфических препаратов моноклональных антител принято считать активацию классического иммунного ответа через комплементзависимую цитотоксичность и антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность, либо же основной терапевтический упор делается на конъюгированный с GD2-специфичным антителом (или его фрагментом) цитотоксический агент, в то время как собственная функциональная активность GD2 остается неизученной. Однако в последнее время появились работы, в которых была показана прямая индукция клеточной гибели антителами к ганглиозиду GD2 в клетках различных опухолевых клеточных линий. Развитие данной темы видится нам перспективным, так как использование собственной цитотоксической активности GD2-связывающих фрагментов антител позволит решить большинство перечисленных выше проблем.

2.1.5 Предполагаемые механизмы прямой цитотоксической активности GD2-специфичных антител

Прямая индукция клеточной гибели, например, путем запуска апоптоза, за счёт связывания поверхностных антигенов, является нетипичной для всех антител, кроме Fas-специфичных mAb, которые связываются с FasR, ассоциированным с сигнальными молекулами смерти, такими как FADD. Ряд исследований показал, что обработка опухолевых клеточных линий ганглиозид-специфичными антителами приводит к запуску или усилению гибели данных опухолевых клеток [113, 121, 116, 117, 125]. Ганглиозиды не относят к классическим рецепторам смерти, как минимум в силу того, что данные мембранные молекулы не являются белками и не имеют в своей структуре трансмембранных доменов, способных к передаче сигнала гибели внутрь клетки. Однако, известно, что ганглиозиды способны напрямую индуцировать апоптоз CD8⁺ Т-клеток [118], а также выступать медиаторами CD95-опосредованной гибели клеток [119], что указывает на тот факт, что в определенных случаях они играют ключевую роль в процессах клеточной гибели.

Группой Cheresch и др. [120] было показано изменение морфологии и открепление клеток меланомы от фибронектинового субстрата после обработки GD2-специфичным антителами. Похожие данные были получены после обработки опухолевых клеточных линий человека IMR32 (нейробластома), H82 (мелкоклеточный рак лёгких), OVCAR-3 (рак яичников), U87MG (глиома), а также мышинной лимфомы EL4 O-ацетил-GD2-специфичными антителами [113]. Клетки, инкубированные с ганглиозид-специфичными антителами, принимали сферическую форму и образовывали конгломераты, которые либо слабо прикреплялись к дну лунок, либо плавали в питательной среде. Морфологические изменения становились более очевидными через 18 часов после добавления антител и развивались в течение 3 дней. При этом, исследователи отмечают дозозависимость данного процесса, а также корреляцию с уровнем выживаемости опухолевых клеток: чем больше антител связывает мембранные ганглиозиды, тем ниже выживаемость данных клеток. Предполагается, что снижение выживаемости опухолевых клеток происходит за счет ареста клеточного цикла (41% клеток в фазе G1 и 50% клеток в фазе G2/M, так же отмечена повышенная экспрессия p21, который является маркером ареста клеточного цикла), и запуска механизмов апоптоза. Причем авторы отмечают возможность переключения между каспазо-зависимым и независимым путями активации данного процесса, так как использование ингибитора каспаз z-FMK-vad не полностью ингибировало действие использованных антител. Данные выводы основаны на данных по активации p38, повышении уровня экспрессии BAX, выбросе цитохрома C, а также активации каспазы-3.

Эти данные коррелируют с другой работой, в которой были исследованы эффекты GD2-специфичных антител на клетки мелкоклеточного рака легких SCLC. Ученые предполагают, что апоптоз индуцированный GD2-специфичными антителами проходил с дефосфорилированием FAK [37]. Образование свободного пространства между клетками под действием антител, вероятно, вызывается откреплением именно апоптотических клеток. Апоптоз, вызываемый нарушением взаимодействий клетка-субстрат получил название “аноиксис”. В ряде исследований с использованием гиперэкспрессии FAK дикого типа, конститутивно активированных форм FAK и усиленной активации $\beta 1$ интегрина, была показана активная антианоиксисная активность FAK. Механизмы такой антиапоптотической активности FAK включают связывание домена смерти рецептор-взаимодействующего белка, увеличения уровня фосфатидилинозитол 3-киназы (p85) и фосфорилированием Akt.

Индукция апоптоза с дестабилизацией FAK показана с использованием FAK-связывающих пептидов $\beta 1$ интегрина хвоста, микроинъекций анти-FAK антител, и N-концевого домена FAK. Таким образом, уровень активированной FAK является критическим фактором для развития апоптоза как в суспензионных клетках, так и в клетках, формирующих монослой. Кроме дефосфорилирования FAK, повышенный уровень фосфорилирования p38 является значимым параметром индукции апоптоза. Сигнальный путь между дефосфорилированием FAK и активацией p38 в настоящее время не определен. Через 6 часов после добавления GD2-специфических антител была отмечена активация JNK [121], в то время как активация p38 происходит значительно раньше, что говорит о более раннем участии p38 в процессе апоптоза. Разрушение FAK индуцирует активацию p38, а ингибирование p38 не влияет на уровень фосфорилирования FAK, что свидетельствует о том, что p38 в сигнальном пути следует после FAK. Промежуточными адапторными молекулами, ассоциированными с FAK, могут являться p13Cas и paxillin, которые и будут активировать p38.

Наиболее интересным моментом является переключение сигнала на апоптоз при связывании GD2-специфического антитела. Исследователи предполагают, что GD2 ассоциирован на мембране с интегринными, и, таким образом, именно конформационные перестройки в молекулах интегринов могут приводить к дефосфорилированию FAK, потому как интегрины и FAK плотно ассоциированы как физиологически, так и функционально. Образование комплекса, состоящего из GD2, интегрин и FAK, по этой модели является критическим параметром для патогенных свойств клеток SCLC [122]. И именно конформационные перестройки в интегринных определяют дефосфорилирование FAK и активацию p38, что, в конечном итоге, и приводит к апоптозу этих клеток. Однако из этого не следует, что аноиксис является основным путем гибели опухолевых клеток под действием GD2-специфичных антител.

В настоящее время мнения ученых относительно механизмов цитотоксического действия ганглиозид-специфичных антител разделяются. Ряд исследований свидетельствует в пользу запуска механизмов апоптоза опухолевых клеток под действием GD2- и O-ацетил-GD2-специфичных антител по митохондриальному пути с активацией соответствующих каспаз [66, 123, 124]. В то же время, в исследованиях с использованием NeuGcGM3-специфичных антител описывается запуск некроза опухолевых клеток с образованием мембранных пор, при этом данный процесс является каспазо-независимым [71, 125]. Данные расхождения можно объяснить как различным происхождением опухолевых клеточных линий, использованных в данных работах, так и нацеливанием антител на различные опухолеассоциированные ганглиозиды. В нашей группе было показано, что каспазы не играют ключевую роль в процессах клеточной гибели, опосредуемой GD2-специфичными антителами [126]. Таким образом, по нашему мнению, сигнальные пути запуска клеточной гибели, опосредованной GD2-специфичными антителами, являются комплексными и включают в себя признаки апоптоза (например, изменение AVD), некроза (изменение проницаемости мембран), а так же активацию митохондриальных путей запуска клеточной гибели.

2.1.6 Модифицированные фрагменты моноклональных антител в терапии онкологических заболеваний

В последние годы успешно ведутся разработки антител и их производных для хорошо изученных мишеней, таких как рецепторы эпидермального фактора роста ERBB-1, ERBB-2 и CD20, также активно ведется поиск новых мишеней, изучение их биологических свойств и способов цитотоксического воздействия на раковые клетки, несущие эти маркеры. Расширение спектра применения иммунотерапии в лечении онкологических заболеваний, усиление ее эффективности и снижение побочных эффектов являются важнейшими задачами ученых и клиницистов, работающих в данной области [127].

Более 85% злокачественных опухолей человека являются солидными [129], однако из 8 терапевтических противоопухолевых мАт, утвержденных в 2005 году, 5 направлены на лечение гематологических злокачественных новообразований и только 3 (Trastuzumab, Cetuximab, и Bevacizumab) могут быть использованы в терапии солидных опухолей. Причем один из них, Bevacizumab, специфичен к растворимому лиганду (фактору роста эндотелия сосудов), а не к мембранному белку поверхности солидной опухоли [51]. Эта диспропорция отражает проблемы в достижении эффективных концентраций мАт внутри солидных опухолей, а значит и терапевтического эффекта. В случае гематологических опухолей, желаемая концентрация антител в сыворотке может быть достигнута без особых затруднений, в то время как на солидных опухолях антитела связывают как правило только клетки, расположенные на периферии опухоли. Экспериментальные данные, полученные с использованием радиоактивно-меченных моноклональных антител, говорят о том, что в опухоль проникает, как правило, порядка 0,01% от вводимой дозы, что соответствует максимальной внутриопухолевой концентрации антител на уровне 100 нМ [128]. Это согласуется с данными, полученными с использованием ксенотрансплантатов человека у мышей, и является низким показателем, который необходимо увеличивать [129].

Последние достижения в области белковой инженерии позволяют ученым разрабатывать методы преодоления барьеров на пути развития терапевтических моноклональных антител, направленных против солидных опухолей.

Одним из наиболее интересных подходов в данном направлении является использование генно-инженерных методов. Они позволяют экспрессировать фрагменты иммуноглобулинов как индивидуальные белки, тем самым открывая возможность создания большого количества разнообразных производных антител, вносить изменения в их структуру и свойства, приводящие к усилению аффинности, специфичности и ряда других характеристик. Развитие технологий позволило получить к настоящему моменту большое число рекомбинантных фрагментов антител, включая Fab-фрагменты, Fv-фрагменты и scFv-фрагменты.

Рекомбинантные фрагменты антител имеют ряд терапевтических преимуществ по сравнению с полноразмерными молекулами IgG. Во-первых, небольшие размеры позволяют фрагментам значительно быстрее полноразмерных антител проникать вглубь опухолей. Это связано с тем, что моноклональные антитела вследствие ряда физиологических параметров, например, интерстициального давления и структуры опухолевых тканей, имеют тенденцию концентрироваться на периферии опухолей [130]. Во-вторых, небольшие размеры молекул позволяют связываться с эпитопами, недоступными для полноразмерных антител, в частности, с карманами активных сайтов ферментов [131]. Сравнительно быстрое время выведения из организма позволяет конъюгировать фрагменты антител с лекарствами и радионуклидами, что обеспечивает минимальные повреждения здоровых тканей. Также фрагменты антител в меньшей степени сорбируются в печени и в почках, демонстрируя более равномерное распределение в организме относительно целых молекул IgG, что позволяет успешно их использовать для визуализации опухолей. Для фрагментов антител характерно слабое гликозилирование и отсутствие других типов посттрансляционных модификаций, что позволяет использовать прокариотические системы экспрессии для их получения, что значительно дешевле и технологически проще эукариотической экспрессии [47].

Структурные особенности функционально активных фрагментов антител

Основными строительными блоками молекул на основе моноклональных антител являются Fab-фрагменты (55 кДа) и одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv; 25 кДа) [132], оба фрагмента могут быть использованы как отдельно, так и в виде составных единиц более крупной белковой конструкции (Рисунок. 9).

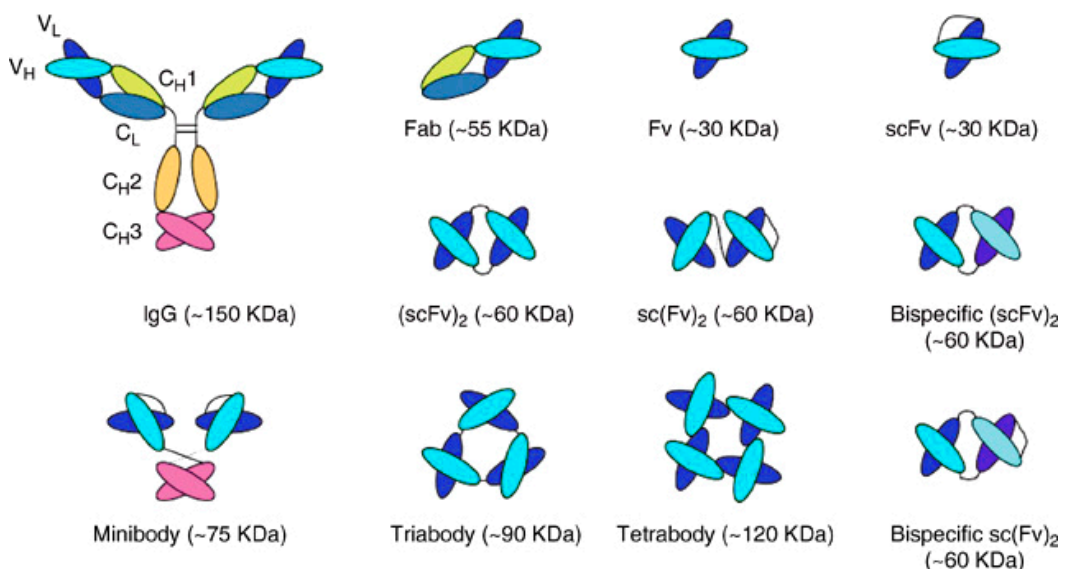


Рисунок 9. Некоторые производные моноклональных антител [133].

Fab-фрагменты моноклональных антител, полученные в результате протеолитического расщепления молекул IgG, включают в себя одиночную легкую цепь антитела, связанную дисульфидной связью с участком тяжелой цепи. Антигенсвязывающий участок (активный центр антител) Fab-фрагмента иммуноглобулина образован гипервариабельными участками H- и L-цепей; он связывает эпитопы антигена. В активном центре имеются специфичные комплементарные участки к определенным антигенным эпитопам. Одноцепочечные Fv-фрагменты (scFv) представляют собой одиночные полипептидные цепи, включающие вариабельные регионы тяжелой и легкой цепей, объединенные при помощи полипептидного мостика, которые образуют единый сайт связывания фрагмента. В последовательность scFv-фрагмента может быть включен остаток цистеина, расположенный с C-конца для формирования (scFv)₂ за счет образования дисульфидного мостика. В случае, когда scFv-фрагмент содержит короткие междоменные линкеры (5 аминокислот или меньше) могут быть получены диатела (~60 kDa). Это предотвращает межмолекулярное образование пар VH и VL доменов на одной цепи, но позволяет межцепочечное образование пар с формированием димеров. Расстояние между сайтами связывания диател составляет порядка 65 Å, что составляет менее половины расстояния антиген-связывающих сайтов полноценной молекулы IgG. Также уменьшенный линкерный участок способствует сборке scFv в тримеры (тритела, ~90 kDa) или тетрамеры (тетратела, ~120 kDa). Повышенная валентность связывания этих мультимеров приводит к высокой avidности и низкой скорости выведения из организма [129].

Существенный интерес исследователей представляет использование фрагментов антител в противоопухолевой терапии в качестве универсальных транспортных молекул для доставки радиоизотопов, токсинов, интерлейкинов и проч. Интересная стратегия предложена в лаборатории под руководством С.М. Деева, в её основе лежит использование рибонуклеазы барназы и её природного ингибитора барстар. Указанные белки образуют очень прочный комплекс, хорошо растворимы в водных системах, устойчивы к протеиназам и могут быть сравнительно легко конъюгированы с фрагментами антител и цитотоксическими агентами. Барназа и барстар, соединенные линкером с scFv-фрагментами, могут служить строительными блоками для мультивалентных мини-антител и их производных, обеспечивая гибкость и сегментную свободу антигенсвязывающих доменов [134]. Модуль барназа-барстар был использован для создания биспецифических мини-антител (425scFv-барстар/4D5scFv-барназа), одновременно распознающих две мишени высокой клинической значимости: EGFR и HER2/neu [135]. На основе барназы и мини-антител к опухолевым маркерам EGFR и ERBB2 были созданы иммуноРНКазы, которым дали название иммунобарназные конъюгаты. Иммунобарназные конъюгаты scFv 425-барназа и scFv 4D5-дибарназа специфически связывались, соответственно, с рецепторами EGFR или ERBB2 на поверхности опухолевых

клеток, интернализировались рецептор-опосредованным эндоцитозом и эффективно индуцировали гибель опухолевых клеток.

В настоящее время разрабатывается большое число scFv-фрагментов антител и препаратов на их основе для терапевтического применения. Одним из важнейших преимуществ одноцепочечных переменных фрагментов антител является их совместимость с бактериальными системами экспрессии.

Структурные особенности scFv-фрагментов антител

scFv-фрагменты являются наименьшими стабильными единицами молекулы иммуноглобулина с функциями антиген-связывающей активности.

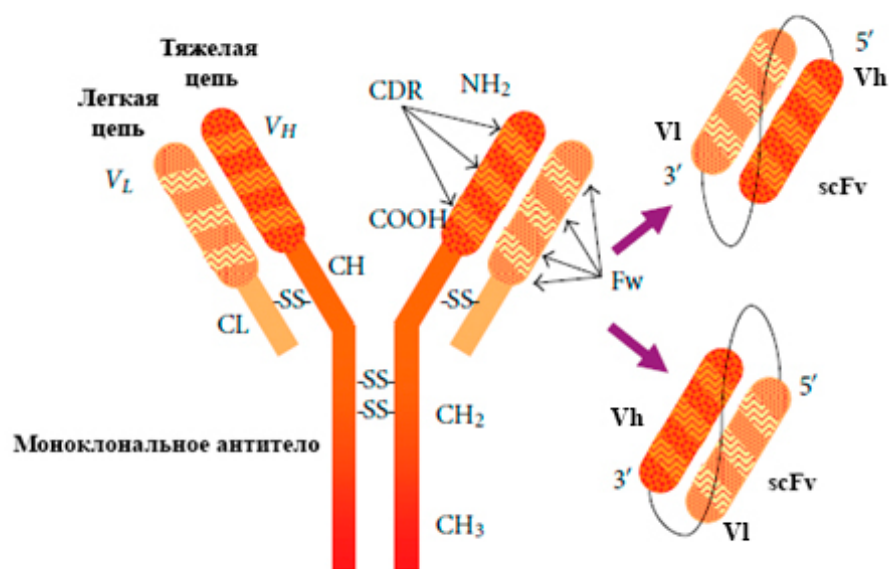


Рисунок 10. Схематическое изображение моноклонального антитела и scFv-фрагмента [136].

scFv-фрагмент состоит из переменных регионов тяжелых (Vh) и легких (Vl) цепей, соединенных вместе при помощи пептидного линкера (Рисунок 10). Длина гибкого пептидного линкера, используемого для связывания V доменов является критичной для корректной упаковки полипептидной цепи. Ранее было установлено, что пептидный линкер должен формировать интервал 3.5 нм между C-концом одного переменного домена и N-концом другого домена, именно такая длина линкера обеспечивает правильный фолдинг молекулы [137]. Помимо длины линкера, важную роль в правильном фолдинге играет его аминокислотный состав. Необходимо наличие гидрофильных последовательностей, которые позволяют избежать интеркаляции пептида в пространство между переменными доменами в процессе фолдинга. В настоящее время наиболее интенсивно используются конструкции, в которые включены последовательности, обогащенные остатками глицина и серина, которые

обеспечивают гибкость, либо последовательности, в состав которых входят заряженные остатки, например, глутамин или лизин, позволяющие увеличить растворимость [138].

При конструировании scFv-фрагментов можно получить домены, организованные по типу Vh-линкер-VI или VI-линкер-Vh. Одним из наиболее популярных методов сборки с использованием ПЦР является метод, впервые описанный Horton et al. Данный метод позволяет клонировать V домены антител без получения предварительной информации как о нуклеотидной последовательности, так и об аминокислотной последовательности конкретного антитела. Более того, V домены антител могут быть скомбинированы путем *in vitro* рекомбинации после ПЦР Vh и VI генов в плазмиду или фагмиду. И наоборот, scFv может быть сконструирован путем последовательного клонирования или комбинаторного инфицирования [139]. В последнее время было получено большое количество scFv-фрагментов против гаптенов, белков, углеводных остатков, рецепторов, опухолевых антигенов и вирусов, которые могут быть успешно использованы в клинической практике.

Существует два принципиально разных подхода к получению рекомбинантных антител. Первый заключается в получении рекомбинантных аналогов моноклональных антител или их фрагментов, с использованием генетического материала из гибридомных клеток, селезенки иммунизированных мышей и В-лимфоцитов человека [140]. Второй подход связан с созданием множества вариантов нуклеотидных последовательностей (библиотек) с последующим отбором из них антител требуемой специфичности и аффинности, т.е. созданием антител необходимой специфичности *de novo*.

Успешный подход в получении рекомбинантных антител был разработан группой McCafferty, в нём применялся метод фагового дисплея (рекомбинантные антитела, экспрессированные фагами) совместно с технологией селекции по аффинности (biopanning step). Работы McCafferty et al. [141] открыли возможность для *in vitro* селекции scFv-фрагментов из больших библиотек переменных доменов без применения традиционного гибридного метода.

Дисплейные методы получения рекомбинантных антител и их фрагментов

Методы получения рекомбинантных антител или их фрагментов *in vitro* с использованием отбора из библиотек их белковых фрагментов на основе способности связывать антиген носят название дисплейных. Важным достоинством этой группы методов является возможность работать одновременно с нуклеотидной и аминокислотной последовательностью каждого конкретного варианта антитела. Получение рекомбинантных фрагментов антител, с использованием такого подхода, включает три этапа: создание библиотек ДНК рекомбинантных антител, экспрессия и презентация белковых фрагментов антител на

поверхности клеток или фаговых частиц и отбор подходящих белковых фрагментов антител на основе их взаимодействия с антигеном [142].

В 1985 году Smith был первым, кто обнаружил, что чужеродные фрагменты ДНК могут быть слиты с генами, кодирующими р III белок оболочки нелитического нитевидного фага. Они экспрессируются на поверхности вириона без повреждения инфекционной активности фага. Несколько лет спустя McCafferty в своих исследованиях успешно продемонстрировал, что scFv-фрагмент может быть представлен на поверхности фага как функционально активный белок, который сохраняет антиген-связывающую активность. Таким образом, данная технология позволила отбирать редкие клоны и выделять их из большой популяции фагов при помощи необходимых антигенов.

Существует несколько основных типов библиотек, к ним относят библиотеки фаговых дисплеев и библиотеки рибосомальных дисплеев [136]. Каждый тип библиотек имеет свои ограничения и применим для различных целей, в зависимости от природы антигена, прошедшего процедуру селекции в плане аффинности и количества ожидаемых антител. Основанные на источниках генов антител, библиотеки scFv-фрагментов могут быть разделены на 3 различные категории: иммунные, наивные и синтетические. Иммунные библиотеки были сконструированы из генов вариабельных доменов антител В-клеток, полученных из различных видов иммунизированных животных, включая мышей, верблюдов, овец и проч. В этих библиотеках, антитела дуализированы по отношению к антигену, который был использован для иммунизации. Благодаря созреванию аффинности антител *in vivo*, этот подход всегда обеспечивает ряд индивидуальных соединений с различной аффинностью, специфичных по отношению к антигену, однако для каждого антигена остаётся необходимость конструирования отдельной библиотеки.

Наивные библиотеки сконструированы из пула мРНК V генов IgM, полученных от неиммунизированных доноров [143]. В отличие от иммунных библиотек, данные библиотеки не были привязаны к конкретному антигену, и они используются для селекции антител различных специфичностей без необходимости конструирования библиотеки для каждого отдельного антигена. Следовательно, они могут быть применимы для получения фрагментов антител, которые трудно получить с использованием гибридной технологии, в частности, против неиммуногенных или токсических антигенов. Как правило, аффинность scFv-фрагментов, выделенных из небольших наивных библиотек значительно ниже, чем у фрагментов выделенных из больших библиотек. Именно по этой причине размер библиотеки важен для селекции высокоаффинных фрагментов, так же, как и для определения уровня успешной селекции фагов против большого репертуара различных антигенов.

Синтетические библиотеки так же конструируются из не иммунных источников, поскольку их диапазоны были получены синтетически, путем комбинирования генетических последовательностей зародышевых линий с рандомизированными CDR, отвечающих за связывание антигена [144]. Большинство синтетических библиотек человеческих антител позволяют получить CDR3 регионы, которые обычно значительно различаются по степени связывания антигена. В настоящее время существует несколько больших полусинтетических библиотек, одна из наиболее крупных, библиотека Griffin-1 – содержит человеческие scFv-фрагменты. Данное исследование было предпринято Griffiths et al. для реклонирования синтетических тяжелых и легких цепей переменных регионов из 2lox Fd вектора фаговой библиотеки в pHEN2 фагмидный вектор [145].

Помимо этого, существуют библиотеки, сконструированные с использованием технологии рибосомальных дисплеев, в которых используют методы выделения scFv-фрагментов *in vitro* напрямую, без применения фагов и бактерий. На первом этапе, библиотека ДНК scFv-фрагментов транскрибируется и транслируется *in vitro* для создания комплекса мРНК-рибосома-scFv, используемого для селекции на иммобилизованном антигене. мРНК, которые специфически связываются с антигеном, элюируются, подвергаются обратной транскрипции и, окончательно обогащенный регенерированной ДНК пул используется для следующего раунда селекции [146]. Данная технология, может представлять собой мощный инструмент для генерации неограниченного количества высокоспецифичных моноклональных антител *in vitro* и *in vivo*.

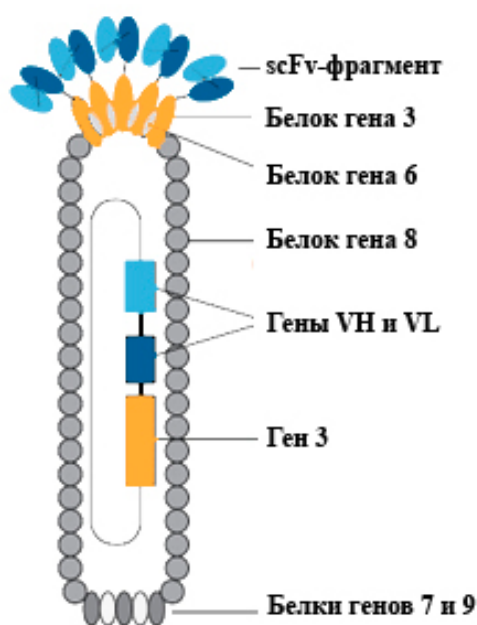


Рисунок 11. Структура нитевидного фага, экспрессирующего scFv-фрагменты антител [141].

Для экспрессии фрагментов антител на поверхности нитевидных бактериофагов (Рисунок 11), гены иммуноглобулинов могут быть слиты как с VIII геном, так и с рIII геном. Одноцепочечный геном нитевидного фага защищен примерно 2700 копиями главного поверхностного белка оболочки (pVIII), который может быть слит вместе с антителами, что приводит к мультивалентному дисплею фрагмента. В то же время, 3 или 5 копий минорного белка оболочки рIII расположены на конце фага, который отвечает за прикрепление к бактерию-хозяину в процессе инфекции. Наиболее часто используемым форматом дисплея является полученный с использованием фагмидного вектора рIII-дисплей, обеспечивающий высокую частоту моновалентного дисплея и, следовательно, лучше подходит для аффинной селекции.

Конечной целью фагового дисплея является селекция фага, который может связывать таргетный антиген с высокой аффинностью из огромного количества неспецифических фаговых клонов. Это достигается многочисленными раундами связывания фага с антигеном, промывок с целью удаления не связавшихся фагов, и выделения специфически связавшихся фагов. После каждого раунда элюированные фаги амплифицируются путем инфицирования *E.coli* для последующего раунда селекции.

В большинстве случаев, антиген иммобилизуют на твердой подложке, например на микротитровальных планках, VIAcore сенсорных чипах, или колонках [147]. Либо же фаговые библиотеки могут быть инкубированы с использованием биотинилированных антител в растворе с последующим захватом антиген-фагового комплекса на стрептавидиновой поверхности. В данном методе, антитела могут быть отобраны на основе аффинности с использованием концентрации антигена намного меньшей, чем желательная константа диссоциации [148].

В случаях, когда очищенный антиген не доступен, например, для интегральных мембранных белков, или он неизвестен (для новых клеточных маркеров или тканевых культур), специфичные антитела должны быть выделены с использованием более сложных источников, таких как цельные клетки или тканевые фрагменты. Фрагменты антител могут быть сконцентрированы в гетерогенных клеточных смесях с использованием флуоресцентно активированных клеток (FACs) сортировкой селекцией. На первом этапе, фаговая библиотека инкубируется с клетками, и несвязанные фаги удаляются в ходе промывок. Затем, интересующие клетки окрашиваются известным флуоресцентно меченым моноклональным антителом и сортируются, отсортированные фаги элюируются и амплифицируются [149].

В большинстве методик, связывающие характеристики антител, полученных из фаговых библиотек, обычно достаточны для дальнейшего их использования в исследовательских целях, например для ELISA, вестерн блота и иммунофлуоресцентных методов. Однако, аффинность и специфичность таких антител недостаточна для диагностических или терапевтических целей.

Эта проблема может быть решена путем направленного мутагенеза к одному или более CDR, с последующей селекцией антител с высокой аффинностью [136].

Экспрессия рекомбинантных антител и их фрагментов

Ранние исследования в области получения рекомбинантных антител в бактериях выявили затруднения, связанные с неправильным формированием пространственной структуры и с нерастворимостью продуцируемого белка. С целью обойти эту проблему Skerra и Pluckthun [150] предложили “one-step-forward” технологию, которая позволила использовать для экспрессии только определенные части молекул антител (Fab- или Fv-фрагменты). Прорывом для полноценной экспрессии в *E.coli* фрагментов антител стало внедрение нескольких типов векторов (фагмид) для конструирования рекомбинантных антител. Эти векторы способны обеспечить секрецию рекомбинантного белка в периплазматическое пространство с получением водорастворимых фрагментов антител. В последние годы данный метод был значительно улучшен при помощи технологий рекомбинантных ДНК и инжиниринга антител, что позволило клонировать гены антител и успешно экспрессировать фрагменты в бактериях, клетках млекопитающих и дрожжей, растениях, а также клетках насекомых [Ошибка! Залка не определена.].

На сегодняшний день scFv-фрагменты антител могут быть получены в различных экспрессионных системах либо в виде правильно упакованных и активных белков, либо в виде белковых агрегатов, требующих рефолдинга *in vitro* для восстановления биологически активной пространственной структуры. Системы экспрессии рекомбинантных белков отличаются по способности обеспечивать правильный фолдинг и секрецию scFv-фрагментов. Существует ряд правил по созданию векторов и выбору систем экспрессии, каждая из которых имеет свои преимущества и недостатки для продукции активных scFv-фрагментов антител. Для экспрессии негликозилированных фрагментов антител небольшого размера (VL, VH, scFv, dsFv), а также Fab-фрагментов, как правило используют бактериальную и дрожжевую системы экспрессии.

Современные достижения в области генетики и биохимии *E.coli* сделали этот организм наиболее привлекательным инструментом для экспрессии небольших рекомбинантных белков. По сравнению с полноразмерными IgG, которые обладают сложной пространственной структурой и требуют посттрансляционного гликозилирования с использованием дорогостоящей эукариотической системы экспрессии, scFv фрагменты антител, обладающие хорошими характеристиками фолдинга, могут быть легко экспрессированы с использованием данного организма. Следует отметить, что эта система продукции хорошо изучена с физиологической и генетической точки зрения, обладает высокой скоростью роста,

обеспечивает очень высокий выход продукта, до 30% от общего количества белка, и является одной из наиболее дешевых [151].

Разработано несколько различных стратегий, которые могут быть использованы для экспрессии рекомбинантных фрагментов антител в *E.coli*. Одна из них заключается в экспрессии scFv-фрагментов антител напрямую в цитоплазму *E.coli* без использования сигнального пептида. Полипептиды экспрессируются в редуцирующую среду бактериальной цитоплазмы с формированием нерастворимых агрегатов, называемых тельцами включения. Затем требуется ренатурация данных телец включения *in vitro* для восстановления функциональной активности фрагментов [152].

Чтобы обойти эту проблему, используется сигнальный пептид, обеспечивающий прямую секрецию scFv-фрагментов антител в периплазматическое пространство, лежащее между внутренней и внешней мембранами грам-отрицательных бактерий. Согласно Vaneux [153], в периплазматическом пространстве находятся белки шапероны и дисульфидные изомеразы, способствующие правильному фолдингу. Во время транслокации через внутреннюю мембрану в окисляющую среду периплазмы происходит отщепление сигнального пептида, расположенного с N-конца, что обеспечивает взаимодействие цепей и приводит к формированию внутри- и междоменных сульфидных связей. Периплазматическая экспрессия интенсивно применяется для продукции различных scFv-фрагментов антител.

В настоящее время, изучение факторов, позволяющих улучшить как фаговый дисплей, так и периплазматический фолдинг scFv-фрагментов, привело к открытию вспомогательных последовательностей, способствующих уменьшению агрегации и обеспечению правильного фолдинга scFv-фрагментов антител [154]. scFv-фрагменты имеют гидрофобные участки, которые собраны в гидрофобных вариабельных или константных доменах. Поскольку они оказываются экспонированы в растворитель, возможно, что именно они вызывают агрегацию белка в процессе фолдинга. Показано, что замена гидрофобных остатков на гидрофильные значительно улучшает фолдинг *in vivo* [155].

Препараты на основе производных моноклональных антител

В настоящее время 54 препарата на основе фрагментов моноклональных антител проходят клинические испытания, из них три препарата были разрешены к применению в США: ReoPro (abciximab), химерный GPIIb/IIIa-специфичный Fab-фрагмент; Lucentis (ranibizumab), гуманизированный VEGF-A-специфичный Fab-фрагмент; Cimzia (certolizumab pegol), пегилированный гуманизированный TNF- α -специфичный Fab-фрагмент. Помимо этих препаратов, один препарат был разрешен в Китае, 19 (35%) находятся в процессе клинических исследований и 31 (57%) были исключены из исследований. Из этих 54 фрагментов антител 30

являются Fab-фрагментами моноклональных антител (56%), 19 – scFv-фрагментами (35%) и 5 представляют собой третье поколение версий миниантител (9%). Восемь препаратов биспецифичных фрагментов моноклональных антител (15%) проходят клинические испытания в качестве противоопухолевых агентов. При этом два биспецифичных scFv находятся в фазе активных клинических исследований, тогда как для 6 биспецифичных Fab-фрагментов испытания остановлены. Среди всех разрабатываемых препаратов 24 конъюгированы с цитотоксином, либо несут радиоактивную метку [**Ошибка! Закладка не определена.**].

Скорость внедрения препаратов на основе фрагментов моноклональных антител в клинику постоянно возрастает. Более того, молекулярное разнообразие фрагментов антител, используемых для создания препаратов, также растет. До 1996 года в клинические испытания запускались исключительно Fab-фрагменты моноклональных антител. В дополнение к трем препаратам на основе Fab-фрагментов, разрешенных в США и одному, разрешенному в Китае, шесть препаратов на основе фрагментов моноклональных антител в настоящее время находятся на III Фазе клинических исследований (три Fab-фрагмента и три scFv-фрагмента). Два противоопухолевых проекта, проходящих фазу III это Naptumomab estafenatox, конъюгированный с 5T4-специфичным Fab-фрагментом стафилококковый энтеротоксин А (Active Biotech, Швеция) и VB4-845, гуманизированные scFv-фрагменты, конъюгированные с экзотоксином А синегнойной палочки, которые направлены против молекулы клеточной адгезии EpCAM (Viventia biotech, Канада). К фрагментам, не прошедшим испытания относятся Afelimomab, представляющий собой фрагмент мышинового антитела, направленный против фактора некроза опухолей альфа (Abbott, США); MDX-210, биспецифичный мышиный Fab-фрагмент, который связывается с HER2/neu и FcγR1 (CD64; Medarex, США); Rexelizumab, гуманизированный scFv-фрагмент направленный против фактора комплемента C5 (Alexion, США); Aurograb - противоинфекционный препарат, представляющий собой человеческий scFv-фрагмент, связывающий кассетный, АТФ-связывающий транспортер мембраны золотистого стафилококка (Novartis, Швейцария).

Применение scFv-антител в качестве противоопухолевых препаратов

Как и терапевтические моноклональные антитела, фрагменты антител в основном разрабатываются для противоопухолевой терапии и коррекции заболеваний иммунной системы. Среди препаратов на основе фрагментов моноклональных антител, 35 являются противоопухолевыми и 6 иммунологическими, что составляет 65% и 11% от общего пула соответственно. Помимо этого, фрагменты антител также были получены для терапии сердечно-сосудистых/гематологических заболеваний (15%), инфекционных болезней (6%) и офтальмологических патологий (4%).

Фрагменты антител могут быть использованы для создания иммунотоксинов, доставки терапевтических генов и в качестве противоопухолевых интрател. 24 препарата на основе конъюгированных фрагментов моноклональных антител проходили клинические испытания, 12 из них представляют собой конъюгаты с бактериальными токсинами: семь scFv-фрагментов были конъюгированы с экзотоксином синегнойной палочки, 4 Fab-фрагмента были получены в результате слияния со стафилококковым энтеротоксином А, и один Fab-фрагмент был получен связыванием с боуганином, рРНК N-гликозидазой, выделенной из растения *Bougainvillea*. Только 5 из этих 12 кандидатов в настоящее время продолжают проходить клинические испытания, однако два из них уже достигли Фазы III. Одним из примеров иммунотоксина служит конъюгат полностью человеческого анти-fAChR Fab-фрагмента с экзотоксином А синегнойной палочки (scFv 35-ETA) [156]. Помимо этого, опухолеспецифичные scFv-фрагменты могут отвечать за доставку фактора некроза опухолей альфа, интерлейкина-2 или суперантигена стафилококкового энтеротоксина В- для Т-клеточно-опосредованного лизиса опухолевых клеток [157]. 4 препарата на основе фрагментов моноклональных антител были конъюгированы с другими белковыми молекулами, включая интерлейкин-2, TNF- α , эпидермальный фактор роста, фермент карбоксипептидазу 2, которая процессирует пролекарства в активные цитотоксические компоненты. Оставшиеся 7 фрагментов инкорпорировали радиоизотопы, один из них был разрешен к применению в Китае (Metuximab).

Фрагменты антител могут играть важную роль в генной терапии рака, например, для доставки терапевтического гена вместе с использованием вирусного или не вирусного вектора. Как оказалось, вирусные векторы являются достаточно эффективными при доставке терапевтических генов к тканям мишеням и клеточным популяциям, однако их клиническое применение ограничено из-за существенного влияния на иммунный ответ, а существующие не вирусные векторы, лишены достаточной специфичности по сравнению с вирусными векторами. В ряде исследований было показано, что scFv-фрагменты могут быть использованы в качестве переносчиков векторов с терапевтическими генами. Например, группа Kuroki et al. использовала [158] СЕА-специфичные scFv-фрагменты для доставки ретровирусного вектора, который был нацелен на раковый эмбриональный антиген. Данный вектор также нес терапевтический ген NO-синтазы, в результате рекомбинантный ретровирус может связывать, инфицировать и убивать клетки, экспрессирующие СЕА. Другой подход был разработан Li et al. [159], исследователями был получен не вирусный вектор, связанный с анти-ErbB2 scFv-фрагментом специфичным к ErbB2, который гиперэкспрессируется большинством опухолей человека.

Кроме иммунотоксинов и доставки терапевтических генов, разработаны противоопухолевые интратела, которые могут быть не только противовирусными, но и потенциальными противоопухолевыми агентами. В многочисленных исследованиях было показано, что они способны экспрессироваться в клетках, специфически связывая и нейтрализуя ряд онкогенов вместе с сигнальными молекулами. Было обнаружено, что этот процесс эффективно уменьшает опухолевый рост и переключает опухолевые клетки в состояние нормального апоптотического клеточного цикла, ErbB2-специфичные интратела прошли первую фазу клинических испытаний. Лечение включало аденовирус-опосредованную генную терапию в сочетании с интрателами и было эффективным в лечении ErbB2-позитивного рака яичников [160].

Одним из основных преимуществ фрагментов моноклональных антител по сравнению с полноразмерными молекулами является биораспределение в организме. Биораспределение моноклональных антител и их производных зависит от таких факторов, как молекулярная масса, параметры крови, неоднородность структуры и проницаемость тканей и опухолей, плотность распределения антигена-мишени, константы связывания и профиля экспрессии целевого антигена. Основным фактором, определяющим скорость диффузии молекул внутрь опухоли, является молекулярный вес [161]. Скорость диффузии обратно пропорциональна молекулярному радиусу, или кубическому корню из молекулярного веса. Таким образом, препараты scFv-фрагментов диффундируют примерно в 6 раз быстрее, чем полноразмерные молекулы IgG, благодаря своему размеру и ряду других факторов. Молекулярный заряд и форма также влияют на распределение молекул внутри опухоли. В силу своей удлиненной формы и заряда, IgG диффундирует медленнее, чем декстраны аналогичной молекулярной массы и, более того, интерстициальный объем, доступный для диффузии IgG, составляет примерно одну треть от scFv-фрагмента. Анализ 13 производных scFv-фрагментов показал, что молекулы с изоэлектрическими точками от 5 до 9 обладают повышенной способностью к проникновению внутрь опухоли относительно тех, изоэлектрические точки которых выходят за эти границы [162]. Эти результаты позволяют предполагать, что терапевтические белки с изоэлектрическими точками ниже 5 или выше 9 склонны к иммобилизации на сосудистом эндотелии и/или внеклеточном матриксе за счет электростатических взаимодействий.

Помимо этого, небольшие фрагменты антител характеризуются улучшенной фармакокинетикой, то есть они способны значительно быстрее и равномернее проникать вглубь опухолей, при этом, практически не накапливаясь в нормальных тканях и органах, в частности – в печени и почках [163]. Показано, что полноразмерные моноклональные антитела задерживаются в кровеносных сосудах в районе опухоли, в то время как scFv-фрагменты эффективно связываются с антигенами внутри солидных злокачественных новообразований.

Это связано с тем, что большинство опухолевых кровеносных сосудов имеют нерегулярный диаметр, а также различную степень ветвления. В ряде экспериментов было показано, что количество терминальных артериол гепатомы и карциномы лёгких у крыс приближается к 50 на $0,1 \text{ мм}^2$, в то время как в нормальных органах их число не превышает 14. Похожая ситуация наблюдается в случае развития лейкоза, большое число нерегулярных и сильно разветвленных микрососудов наблюдалось в лейкозном костном мозге, в то время как в нормальном костном мозге микрососуды прямые и практически не ветвятся [164]. Эндотелиальные клетки опухолей, которые присутствуют практически во всех опухолевых сосудах, активно делятся, в отличие от клеток эндотелия нормальных тканей. Помимо этого, в опухолевых сосудах практически нет гладкомышечных клеток, вследствие чего клетки эндотелия опухоли не формируют нормального монослоя. Ближе к центру опухоли кровеносные сосуды сильно сжимаются, вследствие неограниченного роста опухолевых клеток в ограниченном пространстве. В результате это препятствует кровотоку и тем самым не дает полноразмерным антителам быстро проникать вглубь солидных опухолей, в то время как использование scFv-фрагментов позволяет избежать подобных проблем. Таким образом, скорость накопления scFv-фрагментов внутри опухоли выше, а время их полувыведения может достигать 12-24 часов [165], что является достаточным условием для связывания с опухолеассоциированными ганглиозидами.

Биораспределение моноклональных антител через час после введения характеризуется повышенной концентрацией в крови, печени, почках и лёгких, в меньших количествах они обнаруживаются в селезенке, надпочечниках, кишечнике, поджелудочной и щитовидной железах. Через 48 часов количество антител в нормальных органах равномерно снижается и достигает максимальной концентрации в опухолевых клетках. В свою очередь большая часть scFv-фрагментов через 30 мин обнаруживается в почках, сравнимые количества детектируются в крови и лёгких, и не более 10% scFv-фрагментов встречаются в различных органах, однако уже через 3 часа они быстро выводятся из организма. При этом максимальная концентрация scFv-фрагментов в опухоли достигается уже через 25 минут. Быстрое накопление в опухоли, а также выведение из организма несвязавшихся scFv-фрагментов обеспечивает отсутствие возможных нежелательных побочных эффектов, обусловленных взаимодействием с мишенями, локализованными на нормальных клетках [166].

Исходя из того, что фрагменты моноклональных антител не содержат Fc-региона, их функциональные эффекты не могут быть обусловлены CDC или ADCC. В этом контексте крайне важна природа мишени, так как фрагменты антител функционируют за счет блокирования действия специфических молекул или действуя в качестве сигнальных молекул. Блокирующая активность достигается за счет предотвращения связывания ростовых факторов, цитокинов или других растворимых медиаторов с их рецепторами, которое осуществляется

либо за счет связывания антител с самими факторами, либо с их рецепторами. Сигнальный эффект основан на связывании рецепторов, которые, в свою очередь, соединены с медиаторами клеточного деления или программируемой клеточной смерти. Таким образом, использование фрагментов рекомбинантных антител в терапии заболеваний должно быть сопряжено глубоким знанием биологических свойств мишеней, на которые они направлены.

Следует отметить, что основным недостатком рекомбинантных белков размером менее 60 кДа, является короткое время полужизни и, соответственно, высокая скорость выведения из организма. Поскольку Fab- и scFv-фрагменты не содержат Fc-региона, они не защищены от деградации за счет FcRn (рецептор, который защищает иммуноглобулины от внутриклеточной деградации). Однако, в настоящее время активно разрабатываются способы решения этой проблемы.

Способы химической модификации фрагментов терапевтических моноклональных антител

Мультимеризация является наиболее очевидной стратегией для увеличения размера и, как следствие, повышения продолжительности жизни фрагментов моноклональных антител. Использование биспецифичных фрагментов моноклональных антител, направленных на сывороточные Ig, обеспечивает Fc-ассоциированные эффекторные функции и тем самым продлевает время жизни молекул в крови. Сравнительно новым подходом является пегилирование фрагментов моноклональных антител, которое достигается за счет химического связывания молекул полиэтиленгликоля с аминокруппами белка, что приводит к увеличению размера молекулы, и, как следствие, ограничению скорости клубочковой фильтрации в почках [4].

Фрагменты антител представляют собой потенциально очень перспективное решение для преодоления нежелательных свойств полноразмерных антител. Как уже упоминалось ранее, фрагменты моноклональных антител имеют меньший размер и поэтому более пригодны для тех случаев, когда необходимо лучшее проникновение в ткани, а короткое время полужизни не является проблемой. Одним из таких направлений является использование фрагментов моноклональных антител для визуализации опухолей. Более высокая подвижность и способность проникать в ткани дает фрагментам моноклональных антител значительные преимущества по сравнению с полноразмерными молекулами антител. Например, фрагменты антител более эффективны для внутриглазных инъекций, или в случае применения в качестве антидотов, за счет их способности к быстрому и обширному распределению в организме. В этом случае их пониженная иммуногенность также весьма выгодна. В том случае, когда основным механизмом действия является связывание молекулы-мишени, Fab-фрагменты могут быть полезнее полноразмерных антител, так как позволяют избежать нежелательной

цитотоксичности, обусловленной Fc-фрагментом. Короткий период полувыведения фрагментов антител в некоторых случаях рассматривается как недостаток для клинического использования, однако для диагностических целей быстрое выведение из организма предпочтительней, так как оно сокращает воздействие на организм активных веществ [178]. То же самое можно сказать о связывании ряда опухолевых антигенов, включая ганглиозид GD2.

Основным недостатком более мелких негликозилированных фрагментов антител по сравнению с полноразмерными антителами является их чрезмерно короткое время полувыведения, которое у людей составляет всего несколько часов по сравнению с 7-21 днем для полноразмерных антител. У крыс период полувыведения немодифицированных Fab-фрагментов составляет всего 0,3-1 ч, по сравнению с 13 днями для целых молекул антител, где за такое продолжительное время полужизни отвечает FcRn механизм рециркуляции [167].

Для улучшения фармакокинетических свойств фрагментов моноклональных антител было разработано несколько технологий. Такие технологические подходы можно разделить на группу методов генетического слияния с другими белками или белковыми доменами (например, с Fc-доменом или альбумином) и химические модификации за счет конъюгации с природными или синтетическими полимерами. К таким химическим методам можно отнести полисиалирование, HESylation® (конъюгация с гидроксипропил крахмалом) и пегилирование [168, 169, 170]. Ковалентная пришивка полиэтиленгликоля (ПЭГ) к белку, известная как реакция пегилирования, является хорошо изученной, широко используемой технологией и удовлетворяет требованиям безопасности и эффективности лекарственных препаратов. В большинстве работ технология пегилирования используется для увеличения времени полужизни Fab-фрагментов [171].

Пегилирование может быть случайным (не избирательным) или сайт-специфичным. В случае не избирательного пегилирования молекулы полиэтиленгликоля преимущественно присоединяются к первичным амино-группам, экспонированным на поверхности остатков лизина. В этой реакции участвуют активированные эфирные или карбонатные остатки цепи ПЭГ. На сайты пришивки полиэтиленгликоля в некоторой степени могут влиять pH и размер молекул ПЭГ. Следует отметить, что значимая селективность реакции не может быть достигнута в случае присутствия большого количества экспонированных на поверхности остатков лизина. Kinstler et al. разработали методику N-концевого пегилирования в качестве потенциально более селективного способа пегилирования [172].

Однако для многих Fab-фрагментов случайное или N-концевое пегилирование является не оптимальным вследствие того, что N-конец Fab-фрагмента содержит эпитоп связывания с антигеном. Различные химические агенты могут быть использованы для нацеливания на тиоловые группы цистеина (Cys) в шарнирной области, которые могут быть селективно

пегилированы с использованием малеимид-активированного полиэтиленгликоля. За счет присоединения ПЭГ к свободному шарнирному Cys на достаточном удалении от эпитопа связывания, биологическая активность таких пегилированных Fab-фрагментов *in vitro* по сравнению с немодифицированными молекулами существенно не снижается [171].

Гибкие цепи полиэтиленгликоля защищают Fab-фрагменты от деградации, но также могут влиять на взаимодействие Fab-фрагментов с молекулами-мишенями. Эта особенность цепей ПЭГ означает, что *in vitro* активности, определяемые в клеточном анализе и за счет определения SPR константы равновесной диссоциации (KD) для пегилированных белков, не способны предсказать терапевтический эффект *in vivo*, поскольку гибкость цепей ПЭГ может являться причиной стерических препятствий и неконформационных изменений. Хотя стерические препятствия могут снижать аффинность связывания с рецептором, это снижение может быть частично компенсировано пролонгированным временем полужизни в циркуляции, которое позволяет осуществить достаточное количество взаимодействий лиганд-рецептор, приводящим к необходимому терапевтическому эффекту [173].

На сегодняшний день FDA одобрено 10 пегилированных продуктов, один из них является пегилированным Fab-фрагментом моноклонального антитела. Certolizumab pegol, зарегистрированный под названием Cimzia (UCB Pharma, Бельгия) был одобрен в 2008 г для лечения болезни Крона и в 2009 г для лечения ревматоидного артрита. Пегилированные Fab-фрагменты Cimzia сконструированы таким образом, что в шарнирной области содержится свободный остаток цистеина. Структурно эта позиция расположена далеко от антиген-связывающего региона и, соответственно, пригодна для специфической конъюгации с 40 кДа разветвленным малеимид-активированным ПЭГ, что приводит к сайт-специфичной конъюгации ПЭГ-белок. В соответствии с опубликованными данными, конъюгация 40 кДа цепи полиэтиленгликоля с Fab-фрагментом может продлевать его время полувыведения вплоть до значений, приближающихся к времени полувыведения полноразмерных антител, что позволяет принимать Cimzia 1 раз в две недели (время полувыведения 14 дней) [**Ошибка! Залка не определена.**, 174].

На различных стадиях доклинических и клинических разработок находятся еще несколько пегилированных Fab-фрагментов. Общей особенностью многих терапевтических Fab-фрагментов является необходимость в моновалентном связывании с антигеном. CDP7657 — моновалентный пегилированный Fab-фрагмент, направленный против человеческого белка CD40L, разработанный для лечения системной красной волчанки и находящийся в I фазе клинических исследований. В доклинических исследованиях было показано, что лечение моновалентными пегилированными Fab-фрагментами эффективно ингибирует функцию CD40L без тромботических осложнений, зачастую связанных с лечением полноразмерными анти-

CD40L моноклональными антителами [175,176]. Другим примером пегилированных Fab-фрагментов, проходящих доклинические испытания, являются FR104. Они являются пегилированными Fab-фрагментами гуманизированных CD28-специфичных моноклональных антител с высокой аффинностью к CD28, который, соответственно, нейтрализует его взаимодействие с CD80/86 лигандами. Благодаря его моновалентной природе, CD28-специфичное антитело блокирует взаимодействия CD28–CD80/86 без индукции каких-либо активационных сигналов в Т-клетках [177]. FR104 пегилирован по С-концевому цистеину, вероятно, за счет использования той же самой стратегии пегилирования, что и в случае с Cimzia.

Альтернативным подходом к пегилированию является присоединение молекул ПЭГ к межцепочечному дисульфидному мостику между легкой и тяжелой цепями Fab-фрагмента (Рисунок 12). После сильного восстановления Fab-фрагмента, молекулы ПЭГ могут быть специфически присоединены к остаткам Cys обеих цепей, и тяжелой, и легкой. Этот тип модификации требует наличия высокостабильных Fab-фрагментов, в противном случае, тяжелая и легкая цепи могут быть разделены благодаря стерическим эффектам пегилированных цепей. Основываясь на опубликованных данных, пегилированные Fab-фрагменты, полученные с использованием вышеупомянутого подхода, зачастую проявляют повышенную химическую и температурную стабильность. Пришивка 20 кДа линейной цепи ПЭГ к каждой цепи Fab-фрагмента приводит к пролонгации периода полужизни конъюгатов у крыс примерно до 31 ч, в то время как присоединение 40 кДа ПЭГ к свободному шарнирному цистеину приводит к увеличению времени полужизни до 51 ч.

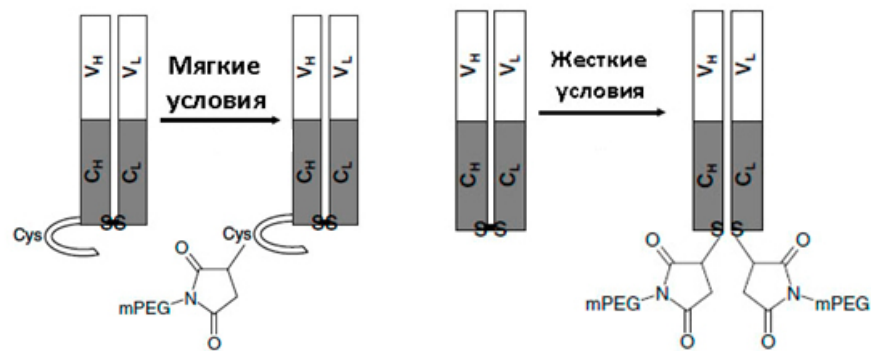


Рисунок 12. Схема пегилирования Fab-фрагментов моноклональных антител [178].

Другая стратегия пегилирования была предложена компанией PolyTherics. Используя специфические ПЭГ моносulfонные реагенты, сайт-специфическое бис-алкилирование обоих атомов серы в экспонированной дисульфидной связи приводит к встраиванию ПЭГ-линкера в дисульфидную связь с образованием пегилированного трехуглеродного мостика [179, 180].

Эта стратегия напоминает сайт-специфическое пегилирование с использованием межцепочечного дисульфидного мостика между легкой и тяжелой цепями, который необходимо редуцировать перед присоединением специального ПЭГ моносульфонного реагента. Наиболее очевидным преимуществом этого подхода по сравнению с традиционным методом конъюгации двух отдельных цепей ПЭГ с цистеиновыми остатками на С-конце обеих цепей Fab-фрагмента, является образование химической связи между обеими цепями. Природная межцепочечная дисульфидная связь заменяется пегилированным линкером. Это достигается при помощи специального ПЭГ реагента, способствующего стабилизации модифицированной молекулы Fab-фрагмента.

Следует отметить, что подобные модификации могут быть использованы не только для терапевтических Fab-фрагментов моноклональных антител. Современные методы генной инженерии позволяют вводить необходимые для реакции пегилирования цистеины в scFv- и прочие фрагменты моноклональных антител, которые также обладают большим терапевтическим потенциалом.

Одноцепочечные переменные фрагменты GD2-специфичных антител

5F11scFv-фрагменты были получены на основе мышинового IgM антитела и были успешно экспрессированы в бактериальной системе [181]. Помимо этого, описаны одноцепочечные переменные фрагменты антител 14.18/14G2a, и получены фрагменты hu3F8. Эти фрагменты обладают молекулярной массой порядка 25 кДа и являются удобным инструментом для создания рекомбинантных слитых белков, которые могут быть экспрессированы в бактериальных системах.

Значительное время полувыведения антител (которое может достигать нескольких дней) в случае радиоиммунотерапии может привести к нежелательному радиоактивному поражению кровеносной системы и жизненно важных органов. В целях повышения терапевтического индекса радиоактивно меченых GD2-специфичных антител был разработан многостадийный адресный подход с использованием GD2-специфичных ScFv-фрагментов 5F11. 5F11 были рекомбинантно слиты со стрептавидином с получением гомотетрамера, обладающего повышенной авидностью к GD2. Данный белок был введен ксенотрансплантированным нейробластомой безтимусным мышам с быстрой очисткой от несвязавшегося белка. Затем мышам вводили небольшой радиоактивный лиганд ^{111}In -DOTA (DOTA хелатирует радионуклиды), конъюгированный с биотином (^{111}In -DOTA-биотин). Такой комплекс быстро проникал внутрь опухолей и специфично связывался с 5F11-стрептавидином (аффинность биотина к стрептавидину <1 pM), в то время как несвязавшийся препарат быстро выводился через почки. Результаты исследований показали значительное увеличение уровня связывания с

опухолевыми клетками с одновременным снижением уровня неспецифических взаимодействий по сравнению с подходом, в котором использовались полноразмерные молекулы IgG антител. Стрептавидин является молекулой бактериального происхождения и потенциально обладает высокой иммуногенностью, в связи с чем, в настоящее время разрабатываются подходы к использованию полноразмерных hu3F8 IgG и DOTA-специфичных scFv-фрагментов в качестве альтернативы стрептавидину [182].

Таким образом, фрагменты GD2-специфических антител на данный момент рассматриваются исключительно для диагностики опухолевого процесса. Прямая цитотоксическая активность полноразмерных антител мало изучена и не рассматривается как один из основных механизмов их противоопухолевого действия, а функциональные эффекты фрагментов GD2-специфичных антител не исследовалась. Проведенные к настоящему времени исследования ограничены и не позволяют сделать однозначные выводы о процессах, запускаемых под действием GD2-специфичных антител и их производных. Таким образом, изучение процессов клеточной гибели опухолевых клеток, опосредуемых функциональной активностью GD2 в результате связывания с антителами и их производными является актуальной задачей современной онкологии.

3. Основная часть

3.1.1 Материалы и методы

Список используемых реактивов

В работе использовали RPMI-1640, RPMI-1640 Hybri-Max, DMEM, EMEM (Sigma, США), фетальную бычью сыворотку (fetal bovine serum) (FBS; HyClone, США) и фетальную бычью сыворотку с низким содержанием иммуноглобулинов (FBS Low IgG; HyClone, США), LB broth (Lysogeny broth) (Amresco, США); агар (GibcoBRL, США), раствор антибиотика/антимикотика (Sigma, США); 2-меркаптоэтанол, Z-VAD-FMK, L-глутамин, L-аланин, L-аргинин, глицерин, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, MgSO_4 , NaH_2PO_4 , NaHCO_3 , CH_3COONa , додецилсульфат натрия, NaN_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, дитиотреитол, фенилметансульфонилфторид, этилендиаминтетрауксусная кислота, глутатион дисульфид, глутатион, бычий сывороточный альбумин, цистамин гидрохлорид, цистамин дигидрохлорид, имидазол, 2,6,10,14-тетраметилпентадекан (пристан), IgG мыши, FITC- и HRP-меченые антитела против иммуноглобулинов мыши, FITC-аннексин V, реактив Бредфорд, параформальдегид, Tween 20, Methoxypolyethylene glycol maleimide (5 кДа/10 кДа) (все – Sigma, США); IPTG (Panreac); актиномицин D; 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI), Hoechst 33342; акриламид; трис-(гидроксиметил)-аминометан (Tris), тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), персульфат аммония (все – Acros organics, США), цветные маркеры для электрофореза (BioRad, Thermo Scientific США); сухое обезжиренное молоко (Roth, Германия); 7-AAD, ТМВ субстрат (Promega, США), ТМВ субстрат, H_2O_2 (Иммунотех, Россия); антитела к ганглиозиду GD2 (14G2a, Santa Cruz, Millipore, США) антитела к ганглиозиду GD3 (R24, Santa Cruz, США), His-специфичные антитела His-probe H-15 (Santa Cruz, США), FLAG-специфичные антитела F1804 (Sigma, США); PBS в таблетках (ICN Biomedicals Inc., США); MabTrap Kit (Amersham, США); Pierce Fab Preparation Kit, Pierce F(ab)'2 Preparation Kit, Metal Enhanced DAB Substrate Kit, Ni-NTA агароза (Thermo Scientific, США), MemCode Reversible Stain (Pierce, США); IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Santa Cruz, США); T4 ДНК лигаза (Thermo, USA); EtOH, MetOH, H_2SO_4 (Россия). Ганглиозиды GM1, GD1b, GD2, GD3 были любезно предоставлены И.И. Михалевым (ИБХ РАН).

Культивирование клеток

Для культивирования эукариотических клеток использовали следующие среды: полная среда (ПС) на основе одной из сред в зависимости от типа клеток: RPMI-1640/RPMI-1640 Hybri-Max/DMEM/EMEM (рН 7,4), содержащих 10% FBS (инактивированная в течение 30 мин при 56°C), 2 mM L-глутамин с добавлением антибиотика/антимикотика (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В).

Клетки гибридомы HB-9326 культивировали в ПС Hybridoma в 6-луночных планшетах и/или флаконах (75 см³; FlowLab, Великобритания), в CO₂-инкубаторе (содержание в атмосфере 5 % CO₂, 37 °C) с пересевом каждые 48 часа. Засевная концентрация 2,5×10⁵ кл/мл. Для подсчёта клеток использовали камеру Горяева. Исходная концентрация клеток рассчитывается по следующей формуле:

$N \sqrt{4 \times M}$, где M – разведение, N – число клеток в большом квадрате; результат ×10⁶.

Клетки мышинной лимфомы EL-4, Jurkat культивировали в ПС на основе RPMI-1640 в 24 луночных планшетах в CO₂- инкубаторе (содержание в атмосфере 5 % CO₂, 37°C) с пересевом каждые 48/72 часа. Засевная концентрация 7,5×10⁴ кл/мл для случая посева через 48 часов и 5×10⁴ для 72 ч. Клетки IMR-32, Neuro-2A культивировали в ПС на основе EMEM, клетки mS, A375, X63, SKOV-3 культивировали в ПС на основе DMEM в тех же условиях [183].

Гибридома HB9326 и клетки нейробластомы IMR-32 любезно предоставлены Вильямом Телфордом (Experimental Transplantation and Immunology Branch, NCI, NIH, США), клетки миеломы X63 любезно предоставлены Антиповой Н.В. (ИБХ РАН), клетки меланомы mS и нейробластомы Neuro-2A любезно предоставлены Дмитриевым С.Е. (Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ), клетки линий A375 и SKOV-3 любезно предоставлены Свищевой Е.В. (ИБХ РАН).

Для культивирования клеток E.coli штаммов HMS174(DE3)pLysS, Rosetta-gami B(DE3)pLysS, RosettaBlue(DE3)pLysS и Rosetta 2(DE3)pLysS использовали чашки с агаром и среду LB (с добавлением селективного антибиотика ампицилина 100 мкг/мл).

Заморозка клеток

Для замораживания эукариотических клеток использовали среду, состоящую из 20 % DMSO, 40 % FBS, 40 % RPMI-1640. В криопробирку помещали 0.5 мл суспензии клеток (2 млн кл/мл) в ПС и по каплям добавляли 0.5 мл охлажденного раствора для заморозки. Заморозку клеток проводили при -20 °C в течение 30 мин, после чего криопробирки помещали в кельвинатор на -135 °C на длительное хранение.

Разморозка клеток

Криопробирку с образцом размораживали при комнатной температуре. После оттаивания клеточную суспензию переносили в пробирку на 15 мл, постепенно разбавляя холодным RPMI-1640 до 6 мл. После отмывки центрифугированием (300 g, 10 мин) клетки рассаживали по 200 тыс в лунки 24-х луночного планшета. На следующий день после разморозки клетки отмывали и рассаживали в рабочей концентрации (см. выше).

Выделение GD2-специфичных мАт ME361, оценка чистоты и связывания с ганглиозидом GD2 полученных антител

Получение кондиционированной среды клеток гибридомы

Гибридомные клетки HB9326 наращивали до критических для выживания концентраций (2×10^6 кл/мл) в культуральных флаконах (75 см³; FlowLab, Великобритания). Содержимое флаконов переносили в 50 мл пробирки и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Супернатант собирали и переносили в новые пробирки, которые центрифугировали 15 мин при 1000 g для освобождения от клеточного дебриса. Перед выделением антител супернатант дополнительно фильтровали через фильтр с порами 0.4 мкм.

Получение асцита

Для получения асцита использовали молодых (1.5-2 месяца) самок мышей линии BALB/c. Для того чтобы предотвратить врастание гибридомных клеток в стенку брюшной полости и образование солидных опухолей, за 2 недели до введения клеток животным внутрибрюшинно инъецировали по 0.5 мл пристана. Клетки гибридомы HB9326 (1×10^6 кл/мл физиологического раствора) вводили внутрибрюшинно. Забор асцитной жидкости осуществляли через 2 недели после введения гибридомных клеток. Для этого мышь обездвиживали методом цервикальной дислокации, ножницами разрезали кожу в области брюшины и отбирали асцит с помощью шприца (2-5 мл). Асцитную жидкость центрифугировали (300 g, 10 мин) для осаждения клеточных элементов и, как и в случае с супернатантом, дополнительно фильтровали через фильтр с порами 0,4 мкм. Полученную асцитную жидкость хранили при -20 °С.

Выделение антител

Для выделения антител из супернатанта/асцита использовали колонку с Protein A агарозой из набора реактивов MAbTrap Kit (GE Healthcare, США). Protein A обладает высоким сродством к IgG различного происхождения. После промывки и активации колонки связывающим буфером на нее наносили асцит и/или кондиционированную среду клеток гибридомы. Колонку промывали от несвязавшихся белков, затем элюировали иммуноглобулины, используя элюирующий буфер. Очищенные антитела собирали в 15 мл пробирку, содержащую 750 мкл нейтрализующего буфера. Нейтрализованный раствор антител переводили в PBS, содержащий азид натрия (0.02%), центрифугированием через фильтры Amicon Ultra (максимальная пропускающая способность 100 кДа) при 1000 g в течение 20 мин.

Хроматографическая очистка антител ME361

Дополнительная очистка полученных на Protein A-колонке антител ME361 проводилась методом ионообменной хроматографии на колонке TSKgel SP 5PW (7.5 мм x 7.5 см) с использованием ВЭЖХ-системы Beckman System gold, подвижная фаза: ацетатный буфер (20 mM, pH 5.7), линейный градиент 0 M – 0.5 M NaCl (в течение 30 мин при комнатной температуре). Скорость потока 1 мл/мин. Белковые фракции собирали с использованием детектора на 280 нм. Очищенную фракцию антител концентрировали и переводили в PBS с добавлением азида натрия (0.02%) на фильтрах Amicon Ultra (максимальная пропускающая способность 100 кДа) при 1000 g в течение 20 мин.

Определение концентрации белка по методу Бредфорд

Для построения калибровочной кривой использовали стандартный раствор IgG мышинной сыворотки (1 мг/мл; Sigma, США). В 96-луночной планшете готовили последовательные разведения IgG от 1 мг/мл до 0.004 мг/мл. Объем каждого разведения составлял 50 мкл. В лунки, содержащие разведения иммуноглобулинов, добавляли по 200 мкл окрашивающего раствора реактива Бредфорд, окрашивание развивалось в течение 5 мин. Измерение оптической плотности проводили при 595 нм на спектрофотометре для планшетов Multiscan FC (Thermo Scientific, США). По полученному калибровочному графику вычисляли концентрацию исследуемых иммуноглобулинов.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Для проведения электрофореза использовали рамку MV-1 для вертикального электрофореза (Хеликон, Россия), как было описано ранее [116]. Растворенные образцы антител, содержащие 20-40 мкг белка, смешивали с буфером для образцов, содержащим лидирующей краситель бромфеноловый синий (Sigma, США) в соотношении 1:1, затем кипятили в течение пяти минут. Буфер для образцов содержал: дитиотриэтол– 0.025% (об/об), додецилсульфат натрия 0.2%, 1M трис(гидроксиметил)аминометан (Tris), 10% глицерин. Электрофорез проводили в 12.5% акриламидном геле по методу Леммли. Гель отмывали от додецилсульфата натрия бидистиллированной водой. Окрашивали гель красителем Кумасси в течение 20 минут и отмывали в горячей 10% уксусной кислоте. Для идентификации результатов, использовали набор цветных маркеров (BioRad, Thermo Scientific, США).

Дот-блот

На предварительно смоченные нитроцеллюлозные мембраны наносили последовательные разведения ганглиозидов GD2, GD3 и GM1 в капле объемом 2 мкл. После высушивания мембраны проводили “забивку” сайтов неспецифического связывания, инкубируя ее в 5% растворе сухого молока, приготовленном на основе TBS (100 мкМ Tris-HCl, 0,9% NaCl, 0,025% NaN₃, pH 7,4) в течение 30 минут при легком покачивании. Затем мембраны отмывали 3 раза в TTBS (TBS+0.1% Tween 20) в течение 5 минут на качалке. Далее проводили окрашивание антителами ME361 и 14G2a (0,5 мкг/мл в TTBS) в течение 2 ч. После инкубации мембраны 3 раза отмывали в TTBS по 5 мин. Затем инкубировали с HRP-конъюгированными антителами против IgG мыши (титр 1:3000) в течение 1 ч. После двух отмывок в TBS проводили визуализацию связывания антител с ганглиозидом GD2 с использованием субстрата TMB (Promega, США). Окрашивание развивалось в течение 1 ч в темноте, реакцию окрашивания останавливали промывкой мембраны в дистиллированной воде.

Иммуноферментный анализ

Ганглиозиды раскапывали в лунки 96-ти луночного планшета Greiner ELISA-plate microton H.V. в 50 мкл этанола. Конечная концентрация ганглиозида составляла 0.25 мкг/лунка. Сорбция ганглиозидов проводилась в течение 18 ч при температуре 4 °С. Забивка сайтов неспецифического связывания осуществлялась при помощи 2% раствора BSA в PBS в течение 1 часа при 37 °С. Отмывку лунок проводили при помощи раствора PBS-T (PBS + Tween 0.05%) 3 раза на автоматическом вошере Autowash II (Labsystems, Испания). В лунки добавляли различные разведения GD2-специфичных антител в PBS-T. Инкубация с антителами длилась не менее 2 часов при 37 °С. После 3 отмывок в PBS-T, в лунки раскапывали анти-видовые HRP-меченные антитела (титр 1:6000 – 1:12000). Через 1 час после инкубации при 37 °С и трех отмывок в PBS-T, в лунки вносили 100 мкл проявителя (субстрат-хромогенная смесь TMB, Иммунотех). После развития окрашивания реакцию останавливали внесением в лунки 50 мкл 10% H₂SO₄. Измерение оптической плотности проводили при 450 нм на планшетном спектрофотометре Multiscan FC (Thermo scientific, США).

Анализ экспрессии GD2 на опухолевых линиях*Окрашивание клеток антителами для проточной цитофлуориметрии*

Клетки линий EL-4, IMR-32, mS, Jurkat, A375 и Neuro-2A отмывали 2 раза в PBA (PBS с добавлением 1% FBS, 0.02% NaN₃). Окрашивание немечеными или AlexaFluor488-мечеными мышиными антителами к GD2 проводили в 100 мкл (0.5 мкг антител на образец) в течение 1 часа при 4 °С. В случае использования немеченых GD2-специфичных антител после одной

отмывки в РВА клетки инкубировали с FITC-мечеными антителами против IgG мыши (титр 1:1000) при 4°C в течение 40 мин. После двух отмывок в PBS объем образца доводили до 0,5 мл и переносили в цитометрические пробирки для последующего измерения на проточном цитофлуориметре EPICS ELITE (Coulter, США). В каждом образце регистрировали не менее 5×10^3 клеток. Обработку результатов проводили с использованием программы WinMDI.

Окрашивание препаратов для конфокальной микроскопии

Клетки линий EL-4, IMR-32, mS, A375 и Neuro-2A рассаживали по 200 тыс. клеток на предметные стекла, помещенные в 6-ти луночный планшет. Через 24 ч культуральную среду удаляли и 1 раз аккуратно промывали в PBS. Для забивки сайтов неспецифического связывания клетки инкубировали в РВА (1% сыворотки, 0.02% NaN_3) в течение 15 мин при комнатной температуре. Окрашивание немечеными или AlexaFluor488-мечеными GD2-специфичными антителами (5 мкг/мл) проводили в 200 мкл РВА в течение 1 часа при 4°C. В случае использования немеченых GD2-специфичных антител после одной отмывки в РВА клетки инкубировали в РВА с FITC-мечеными антителами (титр 1:1000) при 4°C в течение 40 мин. Затем клетки отмывали PBS и окрашивали ядра клеток красителем DAPI/Hoechst 33342 (5 мкг/мл) 10 минут, после чего проводили фиксацию клеток 2% PF. Анализ изображений проводили на конфокальном микроскопе C1 (Nicon, Япония).

Оценка цитотоксических эффектов анти-GD2-мАт на опухолевых линиях

Оценка клеточного объёма

Изменения клеточного объёма детектировали с помощью метода проточной цитофлуориметрии по методике, описанной ранее [184]. Интактные и подвергшиеся воздействию антител и их фрагментов клетки EL-4, различающиеся по морфологии (размерам и гранулированности), дифференцировали по переднему и боковому светорассеянию. В каждом образце регистрировали не менее 1×10^4 клеток. Обработку результатов проводили с использованием программы WinMDI.

MTT-тест

MTT тест осуществляли с использованием стандартной колориметрической процедуры с рядом изменений, описанных ранее [185]. При этом клетки GD2-позитивных и GD2-негативных опухолевых линий инкубировали в 96-луночных планшетах с последовательными разведениями GD2-специфических антител в течение 72 ч, затем центрифугировали (8 мин, 300 g), осадок суспендировали и добавляли по 30 мкл/лунка раствора MTT (5 мг/мл в PBS). После выпадения кристаллов формазана (2–4 ч) его растворяли добавлением 100 мкл DMSO.

Оптическое поглощение измеряли на спектрофотометре для планшетов Multiscan FC (Thermo Scientific, США) при длине волны 540 нм.

Оценка клеточной гибели в PI-тесте

Окрашивание пропидиум иодидом (PI) проводили по общепринятой методике [186] с рядом изменений, описанных ранее [187]. Вкратце, после окончания инкубации с антителами 14G2a и ME361 (5 мкг/мл) в течение 24 ч, клетки GD2-положительных и GD2-отрицательных линий осаждали, фиксировали ледяным 70% EtOH в течение 1 ч при 4 °С, дважды отмывали в PBS (300 г, 10 мин, 4 °С). Затем клетки ресуспендировали в растворе для окрашивания ДНК (PBS, содержащий 20 мкг/мл PI и 10 мкг/мл RNКазы). Измерения проводили на проточном цитофлуориметре EPICS ELITE (Coulter, США). В каждом образце регистрировали не менее 1×10^4 клеток. На гистограммах клетки с фрагментированной ДНК, дифференцировали от нормальных клеток по более низкой интенсивности флуоресценции. Обработку результатов проводили с использованием программы WinMDI.

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

Дизайн конструкции

Для получения GD2-связывающих scFv-фрагментов была использована структура ганглиозид-связывающего фрагмента моноклонального антитела 3F8. Кодонную оптимизацию и синтез кДНК осуществляли в компании GeneScript. Фрагмент вырезали из плазмиды pUC57-3F8 по сайтам рестрикции NdeI и NotI. Полученные фрагменты экстрагировали из агарозного геля и выделяли набором Wizard SV gel and PCR clean-up System (Promega, USA) в соответствии с инструкцией производителя. Экспрессионная кассета была сконструирована на базе T7-промоторной системы pET22b+ обратной трансляцией в Vector NTI и фланкирована сайтами NcoI (входит в состав клонированной последовательности в виде метионина) и BamHI. В ходе работы была сделана точечная замена в N-концевой части белка. Это связано с особенностями клонирования по NcoI сайту в вектор pET22b+, поскольку при использовании NcoI следующим после метионина остатком должен быть глицин. Замена является синонимичной и не затрагивает CDRL1. Использование рестриционного сайта NcoI позволило поместить ген scFv после relB последовательности, повышающей вероятность периплазматической локализации синтезированного белка.

Лигирование проводили T4 ДНК лигазой (Thermo, USA). Полученную лигазную смесь трансформировали в клетки DH5 α , высевали на чашку Петри (2% агар) с селективирующим антибиотиком ампициллином (здесь и далее – 100 мкг/мл), и инкубировали 12-16 часов при 37 °С. Скрининг положительных клонов проводили при помощи ПЦР с коммерческими праймерами

T7 и SP6. Позитивные клоны высевали в 10 мл среды LB, инкубировали 12-16 часов при 37 °С при постоянном покачивании 250 об./мин. Плазмидную ДНК выделяли набором Wizard Plus SV Minipreps (Promega, USA). ДНК анализировали рестрикцией по сайтам NdeI и NotI.

Экспрессия была осуществлена в штамме HMS174(DE3)pLysS *E.coli*.

Экспрессия рекомбинантных GD2-связывающих scFv-фрагментов в E.coli

Замороженные, не индуцированные клетки штамма HMS174(DE3)pLysS, содержащие необходимую плазмиду, шпателем высевали на чашку Петри в 200 мкл среды LB и равномерно растирали по поверхности. Колонии наращивали в течение 18 часов при 37 °С. Затем наиболее крупную единичную колонию шпателем переносили на свежую чашку Петри в 400 мкл. среды LB, равномерно растирая суспензию по поверхности агара. Культуру клеток наращивали в инкубаторе в течение 18 часов при 37 °С.

После этого, осуществляли смыв полученной ночной культуры с чашки Петри в колбы, в объеме не менее 400 мл среды LB. До индукции культуру выращивали не менее 2 часов при комнатной температуре (22 °С) на качалке (230 об/мин) до достижения $OD_{600}=0.2$, после чего, культуру инкубировали при 37 °С. После достижения $OD_{600}=0.65$ производили индукцию продукции белка при помощи IPTG в концентрации 1 мМ. Наращивание биомассы осуществляли в течение 16 часов. Затем проводили центрифугирование при 10 000 g в течение 20 минут. Осадок клеток замораживали при -70 °С.

Для анализа белков в ПААГ-электрофорезе отбирали по 1 мл культуры до и после индукции.

Выделение периплазматической фракции белка

Клетки *E.coli*, осажденные из 0.5 л культуры быстро ресуспендировали в 30 мл буфера, содержащего 30 mM Tris-HCl и 20% сахарозы с добавлением 1mM EDTA. Раствор инкубировали с перемешиванием на магнитной мешалке на протяжении 10 мин при комнатной температуре. Затем проводили центрифугирование при 10 000 g на протяжении 10 мин при 4 °С, супернатант удаляли. Осадок ресуспендировали в 30 мл. ледяного 5 mM MgSO₄ и инкубировали в течение 10 мин. на льду. После центрифугирования при 10 000 g на протяжении 10 мин при 4 °С осадок удаляли, а супернатант, содержащий фракцию периплазматических белков, использовали для последующего анализа.

Выделение белка в денатурирующих условиях

Клетки *E.coli*, осажденные из 0.5 л культуры тщательно ресуспендировали в 5 мл буфера, содержащего 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8M мочевины (pH 7.2). Инкубация длилась не

менее 12 часов при 4 °С. Лизат центрифугировали при 10 000 g в течение 20 мин при комнатной температуре. Осадок, содержащий клеточный дебрис, удаляли. Супернатант использовали для последующих операций.

Очистка рекомбинантных GD2-связывающих scFv-фрагментов

К полученным ранее фракциям, содержащим scFv-фрагменты, добавили 50% суспензии Ni-NTA агарозы и инкубировали 1 час при 4 °С с легким перемешиванием. Затем, суспензию поместили в колонку и дважды промыли Ni-NTA агарозу буфером, содержащим 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M мочевины (pH 6.3). Элюцию проводили четырехкратно, с использованием буферов, содержащих 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M мочевины (pH 5.9 и pH 4.5). Колонку с Ni-NTA агарозой хранили в 30% EtOH.

Оценку чистоты полученных scFv-фрагментов проводили методом ПААГ-электрофореза по описанной выше методике.

Вестерн-блот

После электрофореза в 12.5% ПААГ в денатурирующих условиях, белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Sigma-Aldrich, США), предварительно смоченную в трансфер-буфере (47.9 mM Tris, 38.6 mM глицина, 0.0385% SDS, 20% метанола), методом полусухого переноса, используя камеру V10-SDB (Biostep, Германия). Для визуализации белков на мембране после переноса использовали набор для обратимого окрашивания MemCode Reversible Stain (Pierce, США). После этого проводили блокирование сайтов неспецифического связывания мембраны путем инкубации в 5% растворе сухого обезжиренного молока (Roth, Германия) в течение часа при легком покачивании. После трех отмывок в PBS, содержащем 0.1% Tween 20, проводили инкубацию с His-специфичными антителами (His-probe H-15, Santa Cruz, США) 1:1000 или FLAG-специфичными антителами 1:2000 (F1804, Sigma) в течение часа. После трех отмывок в PBS, содержащем 0.1% Tween 20, мембраны инкубировали с вторичными антивидовыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1:1000. Реакцию визуализации специфических белков на мембране проводили, используя Metal Enhanced DAB Substrate Kit (Thermo Scientific, США), согласно методике производителя.

Рефолдинг полученных scFv-фрагментов

Перед началом эксперимента к буферу для ренатурации, содержащему 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 M аргинина, добавляли 5 mM цистамин гидрохлорида и 0.5 mM цистамин дигидрохлорида. К раствору белка, полученного ранее в денатурирующих условиях, добавляли

5 mM свежеприготовленного DTT, затем проводили центрифугирование 10 мин. при 12 000 g. Затем раствор концентрировали центрифугированием при помощи фильтра Amicon Ultra-4, супернатант отбирали шприцем с тонкой иглой и по каплям вносили в буфер для ренатурации. Инкубация длилась 3 дня при плавном перемешивании на магнитной мешалке при температуре 4 °C. Диализ полученного белка проводили против 2 л. PBS буфера при 4 °C в течение 18 часов. Полученный раствор белка концентрировали, используя фильтры Amicon Ultra-4 (максимальная пропускающая способность 10 кДа).

Оценка взаимодействия scFv-фрагментов с ганглиозидом GD2 осуществляли методами проточной цитофлуориметрии и ИФА с использованием His-специфичных и FLAG-специфичных антител по описанным выше методикам.

Создание гибридомы, продуцирующей GD2-специфичные моноклональные антитела

Подбор и синтез GD2-мимикрирующих пептидов

В работе был использован подход по иммунизации лабораторных животных при помощи GD2-мимикрирующего пептида 14G2a-94L – RCNPNMEPPRCWAAEGD, а так же его KLH-модифицированного аналога 14G2a-94L-KLH (RCNPNMEPPRCWAAEGD-KLH), синтезированных методом твердофазного синтеза. Пришивка KLH осуществлялась с N-конца пептидов (Peptide 2.0 inc, США). Структура данных пептидов основана на результатах рентгеноструктурного анализа комплексов GD2-антитело.

Схема иммунизации мышей

Самки мышей линии BALB/c возрастом 10 недель были четырёхкратно иммунизированы 40 мкг GD2-мимикрирующих пептидов, растворенных в стерильном PBS в объёме 250 мкл, смешанными с равным объемом полного адьюванта Фрейнда до образования устойчивой эмульсии. Иммунизация проводилась внутрибрюшинно с интервалами раз в две недели. Эффективность иммунизации и оценку продукции антител в сыворотке крови животных проводили методом иммуноферментного анализа сыворотки животных, согласно методике, описанной выше. Через 3 дня после последней иммунизации, выделенные мышинные спленциты были слиты с клетками миеломы X63 в полиэтиленгликоле согласно общепринятой методике [67] с использованием ПЭГ 4 000.

Отбор и анализ моноклонов

Поиск и отбор клонов, продуцирующих GD2-специфичные моноклональные антитела, осуществлялся методом лимитирующих разведений. Контроль эффективности и

специфичности связывания полученных антител с ганглиозидом GD2 осуществлялся методом иммуноферментного анализа (как описано выше).

Наработка и выделение выбранных антител осуществлялась с использованием асцитов и Protein A, согласно методике, описанной выше.

Изотипирование

Изотипирование полученных антител проводилось при помощи IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Santa Cruz, США) согласно методике производителя.

Хроматографическая очистка антител класса IgM

Дополнительная очистка полученных на Protein A-колонке антител 9P-L1 проводилась методом гель фильтрации на колонке TSKgel 2000pw (7.5 мм x 300 мм, Tosoh Corporation, Japan) с использованием ВЭЖХ-системы Beckman System gold в PBS. Скорость потока 1 мл/мин. Белковые фракции собирали с использованием детектора на 280 нм. Очищенную фракцию антител концентрировали на фильтрах Amicon Ultra (максимальная пропускающая способность 100 кДа) при 1000 g в течение 20 мин.

Оценка кросс-реактивности полученных GD2-специфичных антител класса IgM с ганглиозидами GM1, GD1b и GD3 проводилась согласно описанной выше методике ИФА.

Получение фрагментов GD2-специфичных антител класса IgM

Получение и очистка фрагментов антител 9P-L1 осуществлялась с использованием иммобилизованного пепсина (Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. К оптимальному количеству пепсина, иммобилизованному на агарозе, добавляли 0.5 мл раствора антител (1 мг/мл в цитратном буфере, pH 4.6), инкубировали в течение 4 ч при 37 °C и непрерывном перемешивании. По окончании инкубации от иммобилизованного на агарозе пепсина освобождались центрифугированием (1500 об/мин, 10 мин), и полученный супернатант, содержащий фрагменты антител, наносили на Protein A колонку для последующей очистки согласно методике, описанной выше.

Оценку связывающей способности полученных фрагментов антител проводили аналогично вышеописанным процедурам при помощи проточной цитофлуориметрии.

Получение Fab-фрагментов антител ME361, оценка чистоты и связывания с ганглиозидом GD2

Получение Fab-фрагментов антител ME361

Выделение и очистка Fab-фрагментов антител ME361 осуществлялась с использованием набора реактивов Pierce Fab Preparation Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя с рядом модификаций, описанных ранее [188]. К оптимальному количеству эндопептидазы папаина, иммобилизованной на агарозе, добавляли 0.5 мл раствора антител (1 мг/мл), инкубировали в PBS, содержащем 0.35% цистеина, в течение 4 ч при 37 °С и непрерывном перемешивании. По окончании инкубации от иммобилизованного на агарозе папаина освобождались центрифугированием (1500 об/мин, 10 мин), и полученный супернатант, содержащий Fab- и Fc-фрагменты антител, наносили на колонку с Protein A-агарозой для очистки Fab-фрагментов. Fab-фрагменты были элюированы в свободном объеме и переведены в PBS центрифугированием через фильтры Amicon Ultra (максимальная пропускающая способность 10 кДа) при 1000 g в течение 20 мин.

Чистоту полученных фракций Fab-фрагментов оценивали с помощью ПААГ электрофореза (см. выше). Сохранение связывающих свойств Fab-фрагментов с ганглиозидом GD2 анализировали с помощью метода ИФА, конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии, как описано выше, используя при окрашивании клеток вторичные анти-Fab антитела, меченные FITC.

Сравнительная оценка цитотоксических эффектов и анализ механизмов клеточной гибели, индуцированной GD2-специфичными антителами ME361 и их Fab-фрагментами

Для оценки цитотоксических эффектов Fab-фрагментов на клеточных линиях были использованы PI-тест и МТТ-тест, а также методы проточной цитометрии (описание методов дано выше). Для изучения участия каспаз в клеточной гибели применяли PI-тест с использованием общего ингибитора каспаз Z-VAD-FMK (конечная концентрация ингибитора 10 мкМ) по методике, описанной ранее [189].

Оценка функциональной активности митохондрий

Для определения изменения митохондриального потенциала был использован флуоресцентный зонд DiOC₆(3) (3,3-дигексилосакарбоцианин иодид; возбуждение – 484 нм, испускание – 501 нм), который за счёт своих гидрофильных групп связывается с митохондриями живых клеток. Окрашивание проводилось на живых клетках после 24-х

часовой инкубации с GD2-специфичными антителами и Fab-фрагментами. После 1 отмытки в PBS (300 g, 10 мин) клетки (5×10^5) инкубировали с 20 нМ DiOC₆(3) в течение 20 мин. По окончании инкубации клетки дважды отмывали в PBS центрифугированием и переносили в цитометрические пробирки. В каждом образце регистрировали не менее 1×10^4 клеток. Измерения проводили на цитофлуориметре EPICS ELITE (Coulter, США).

Оценка проницаемости плазматических мембран

Оценку проницаемости плазматической мембраны клеток проводили с помощью флуоресцентного ДНК-красителя 7-AAD. Перед окрашиванием клетки однократно отмывали в PBS и к осадку добавляли 0.5 мл раствора 7-AAD (2 мкг/мл). Флуоресценцию клеток регистрировали цитофлуориметрически. В каждом образце регистрировали не менее 1×10^4 клеток. Обработку результатов проводили с использованием программы WinMDI.

Окрашивание клеток FITC-Аннексином V

Процедуру проводили в соответствии с протоколом фирмы-производителя с рядом модификаций, описанных ранее [190]. После суточной инкубации с антителами и их фрагментами, клетки (5×10^5) отмывали холодным PBS (300 g, 10 мин, 4°C), затем отмывали связывающим буферным раствором (PBS, содержащий 150 мМ CaCl₂). Окрашивание живых клеток проводили в 100 мкл связывающего буфера, содержащего FITC-аннексин V (1 мкг/образец) и PI (0,1 мкг/образец) в течение 20 мин при 4°C. После инкубации клеточную суспензию доводили до 500 мкл охлажденным связывающим буфером, и образцы анализировали на цитофлуориметре EPICS ELITE (Coulter, США) (не позднее, чем через 1 ч после окрашивания).

Пегилирование Fab-фрагментов ME361. Сравнение связывающей и цитотоксической активностей исходных и модифицированных фрагментов

Монопегилирование Fab-фрагментов антител ME361

Для проведения реакции монопегилирования Fab-фрагментов моноклональных антител к раствору Fab-фрагментов (2.5 мг/мл) в буфере для пегилирования (20 мМ фосфатный буфер, с добавлением 50 мМ NaCl, 10 мМ EDTA, pH 7.5) добавляли стоковый раствор 15 мМ TCEP до достижения конечной концентрации TCEP 0.1 мМ. Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 90 мин при аккуратном перемешивании. От восстановителя избавлялись центрифугированием через фильтры Amicon Ultra-4 (максимальная пропускающая способность

10 кДа). Восстановленные Fab-фрагменты инкубировали при комнатной температуре в течение 24 ч для того, чтобы достичь восстановления межцепочечного дисульфидного мостика. Затем к раствору Fab-фрагментов добавляли 400 мкл стокового раствора (50 мг/мл) ПЭГ 5 / 10 кДа (с 5 молярным избытком ПЭГ-малеимида). Инкубация длилась 16–18 ч при комнатной температуре с аккуратным перемешиванием на шейкере. После инкубации, для разделения полученных пегелированных Fab-фрагментов антител, была использована предварительно уравновешенная TSK-GEL SP-5PW колонка (25 мМ CH_3COOH , pH 4.0) с использованием ВЭЖХ-системы Beckman System gold, подвижная фаза: элюирующий буфер (25 мМ CH_3COOH , pH 4.0), линейный градиент 0 мМ – 250 мМ NaCl (в течение 90 мин при комнатной температуре, скорость потока 1 мл/мин). Эффективность пегелирования оценивали с помощью ПААГ-электрофореза.

Поверхностное окрашивание монопегелированными Fab-фрагментами антител ME361 опухолевых клеточных линий для проточной цитометрии а также изучение цитотоксических эффектов проводили, как описано выше.

Эксперименты *in vivo*

Создание сингенной мышинной модели рака

Для создания опухолевой модели использовали самцов мышей линии C57Bl/6 в возрасте 3-4 недель как было описано ранее [191]. Клетки линии EL-4 собирали с подложки тщательным суспендированием, отмывали 2 раза центрифугированием (8 мин при 1200 об/мин) и ресуспендировали в стерильном PBS (ICN Biomedicals Inc., США). Экспериментальным животным в хвостовую вену вводили 3×10^4 клеток в 100 мкл стерильного PBS, контрольным животным – такой же объем PBS без клеток.

Дизайн эксперимента

Все животные (n=30) были разделены на 6 групп:

Группа 1 (n=5) – контрольные животные (без опухоли, вводили PBS);

Группа 2 (n=5) – животные, которым в/в вводили 3×10^4 клеток линии EL-4;

Группа 3 (n=5) – животные, которым в/в вводили GD2-специфичные антитела ME361 (200 мкг/мышь) через 7 дней после введения опухолевых клеток;

Группа 4 (n=5) – животные, которым через 7 дней после введения опухолевых клеток в/в вводили Fab-фрагменты антител ME361 (200 мкг/мышь);

Группа 5 (n=5) – животные, которым через 7 дней после введения опухолевых клеток в/в вводили монопегелированные Fab-фрагменты антител ME361 (200 мкг/мышь);

Группа 6 (n=5) – животные, которым двукратно в/в вводили Fab GD2-mAb через 7 и 14 дней (по 200 мкг/мышь/инъекция) после введения опухолевых клеток.

Животных содержали в стандартных условиях вивария ИБХ РАН (12 часов – день, 12 часов – ночь) со свободным доступом к брикетированному корму и воде. Два раза в неделю производили взвешивание мышей на аналитических весах.

Анализ противоопухолевых эффектов

Животных забивали методом цервикальной дислокации через 30 дней после инъекции опухолевых клеток EL-4. После вскрытия визуально оценивали наличие метастаз и их количество в паренхиматозных органах и извлекали печень и почки, измеряли их массу.

Оценка фармакокинетики

Мышь наркотизировали эфиром до состояния глубокого сна. Хвост обрабатывали 70% EtOH, стерильным скальпелем производили небольшой надрез в области хвостовой вены. 100 мкл крови собирали в микроцентрифужную пробирку, после чего разрез дополнительно обрабатывали спиртом. Полученные образцы оставляли на 30 минут при комнатной температуре, затем центрифугировали при 7 000 g в течение 10 минут для получения очищенной сыворотки. Полученную сыворотку хранили при температуре не выше -20 С.

Оценка времени полувыведения Fab- и монопегелированных Fab-фрагментов осуществлялась методом иммуноферментного анализа. После выделения сыворотки центрифугированием для освобождения от клеточных элементов (8 мин, 300g), образцы наносились в лунки 96-ти луночного планшета с сорбированным ганглиозидом GD2. Дальнейшие операции производились согласно методике, описанной выше.

Обработка результатов и статистический анализ

Анализ цитометрических результатов проводили в программе WinMDI. Построение графиков выполняли в программе SigmaPlot, MS Excel. Анализ данных ПААГ-электрофореза проводили с использованием программы Image J. Представленные результаты являются средним значением как минимум трех независимых экспериментов. Статистический анализ проводился с использованием Student's t-test, Mann–Whitney Rank Sum Test, Analysis of Variance (ANOVA), в то время как различия между средними значениями определялись с помощью Dunnett's multiple comparison а также Newman-Keuls multiple comparison post-hoc тесты. Уровни значимости $P < 0.05$ считались статистически значимыми.

4. Результаты и их обсуждение

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

В предыдущей работе нашей группы была показана эффективная и прямая цитотоксическая активность GD2-специфичных моноклональных антител на клетках мышинной лимфомы EL-4, гиперэкспрессирующих ганглиозид GD2 [116]. В литературе имеется ограниченное количество разрозненных данных о цитотоксических эффектах анти-GD2 мАт, которые были получены либо на одной клеточной линии, либо с использованием одного варианта антител [113, 123]. В связи с недостаточностью данных о том, насколько общим феноменом является индукция клеточной гибели GD2-специфичными антителами, была поставлена задача проанализировать опухолевые клеточные линии, относящиеся к различным типам рака, по экспрессии ганглиозида GD2. Изучение эффектов различных GD2-специфичных антител на клетки разных типов рака, несущих и не несущих на своей поверхности данный маркер, позволит определить является ли показанная ранее цитотоксическая активность антител на конкретной линии частным случаем или же общей закономерностью для всех клеток, экспрессирующих ганглиозид GD2. Кроме того, решение данного вопроса позволит аргументировать необходимость и обоснованность дальнейших исследований, направленных на получение либо создание фрагментов GD2-специфичных антител и оценку их действия на опухолевые клетки.

Из литературных данных известно, что ганглиозид GD2 экспрессируется клетками таких опухолей как нейробластома, глиома, мелкоклеточный рак легких, меланома и лимфома [30]. Для выбора наиболее оптимальной клеточной модели была проанализирована экспрессия ганглиозида GD2 на опухолевых клеточных линиях различного происхождения. Основываясь на полученных предварительных данных по анализу экспрессии GD2 более чем на 20 клеточных линиях, было выбрано 3 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, клетки мышинной нейробластомы Neuro-2A, а также клетки меланомы человека A375. Поверхностное окрашивание данных клеток AlexaFluor488-мечеными GD2-специфичными моноклональными антителами 14G2a и последующий 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 (Рисунок 13 А), в то же время клетки линий Jurkat, Neuro-2A и A375 не

экспрессируют на своей поверхности GD2 или экспрессируют его в минимальном количестве (Рисунок 13 Б), и их можно считать GD2-негативными линиями.

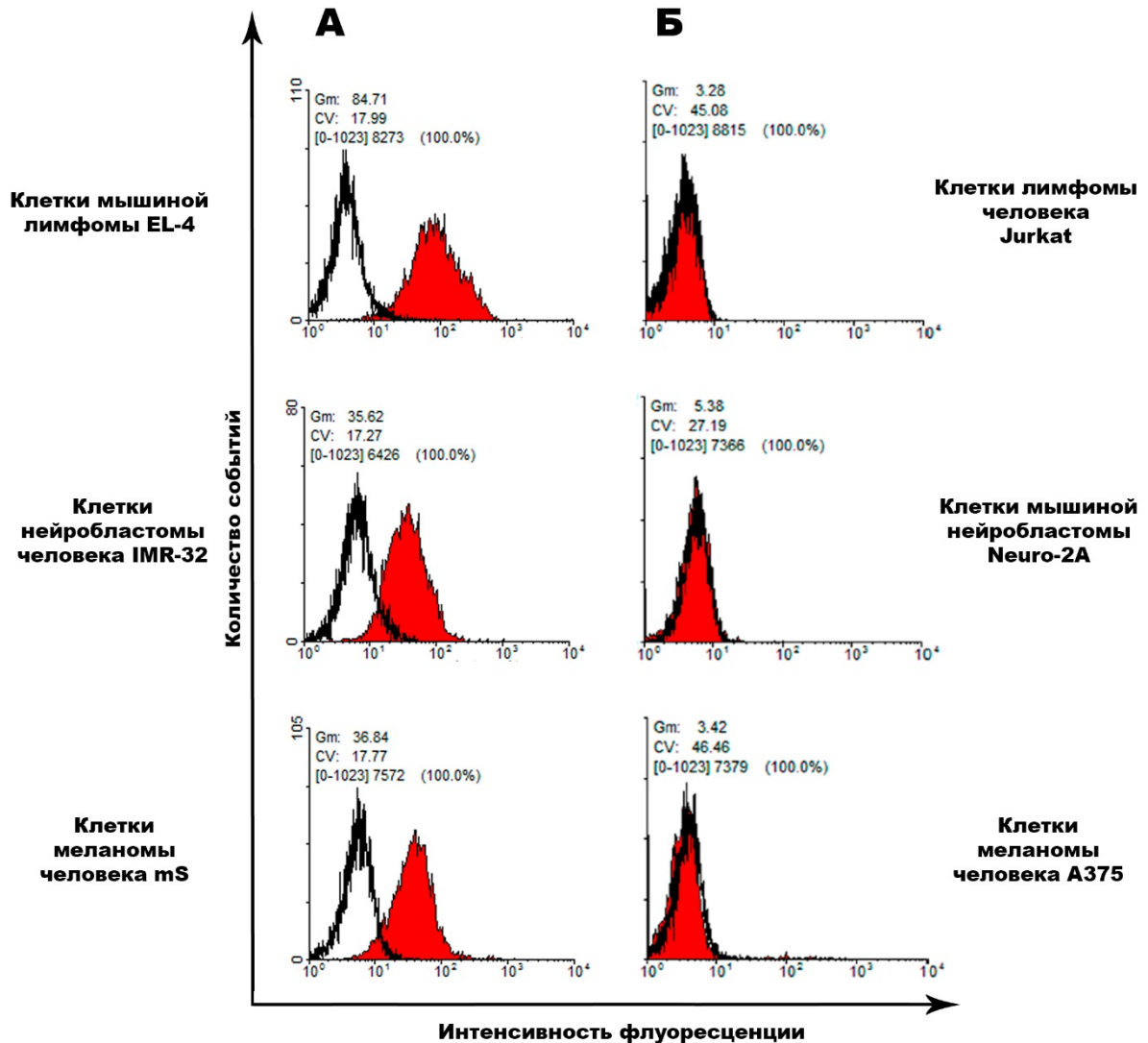


Рисунок 13. Экспрессия ганглиозида GD2 клетками линий EL-4, IMR-32, mS, Jurkat, Neuro-2a, и A375. Цитометрические измерения клеток, окрашенных GD2-специфичными антителами 14G2a, конъюгированными с флуоресцентным красителем AlexaFluor488 (5 мкг/мл). Пики, обозначенные цветом, отражают флуоресценцию клеток, окрашенных GD2-мAb, контур – пик контрольных клеток, окрашенных анти-изотипическими антителами. Представлены результаты репрезентативного эксперимента. Было проведено не менее 3 экспериментов.

Гистограммы, представленные на Рисунке 13 А, демонстрирует увеличение уровня средней интенсивности флуоресценции клеток линий EL-4, IMR-32 и mS, окрашенных GD2-специфичными антителами 14G2a, по сравнению с контрольными клетками. Значимое увеличение интенсивности флуоресценции окрашенных клеток всех трех линий говорит о высокой экспрессии ганглиозида GD2, но в то же время уровень экспрессии GD2 в этих линиях различается. Уровень интенсивности флуоресценции для поверхностного ганглиозида GD2 в

клетках лимфомы EL-4 был в 2.5 ± 0.3 раза выше, чем для клеток меланомы mS и в 2.7 ± 0.4 раза выше, чем для клеток нейробластомы IMR-32. Для клеток линий Jurkat, Neuro-2A и A375 окрашивание флуоресцентномечеными антителами 14G2a не привело к сдвигу пика относительно контрольных клеток, что говорит об отсутствии связывания антител с поверхностью клеток, вследствие отсутствия на них нужного антигена (Рисунок 13 Б). Аналогичные эксперименты для всех клеточных линий были проведены с использованием других GD2-специфичных антител ME361, результаты этих экспериментов полностью совпали с результатами, полученными при окрашивании клеток GD2-мАт 14G2a (данные не представлены).

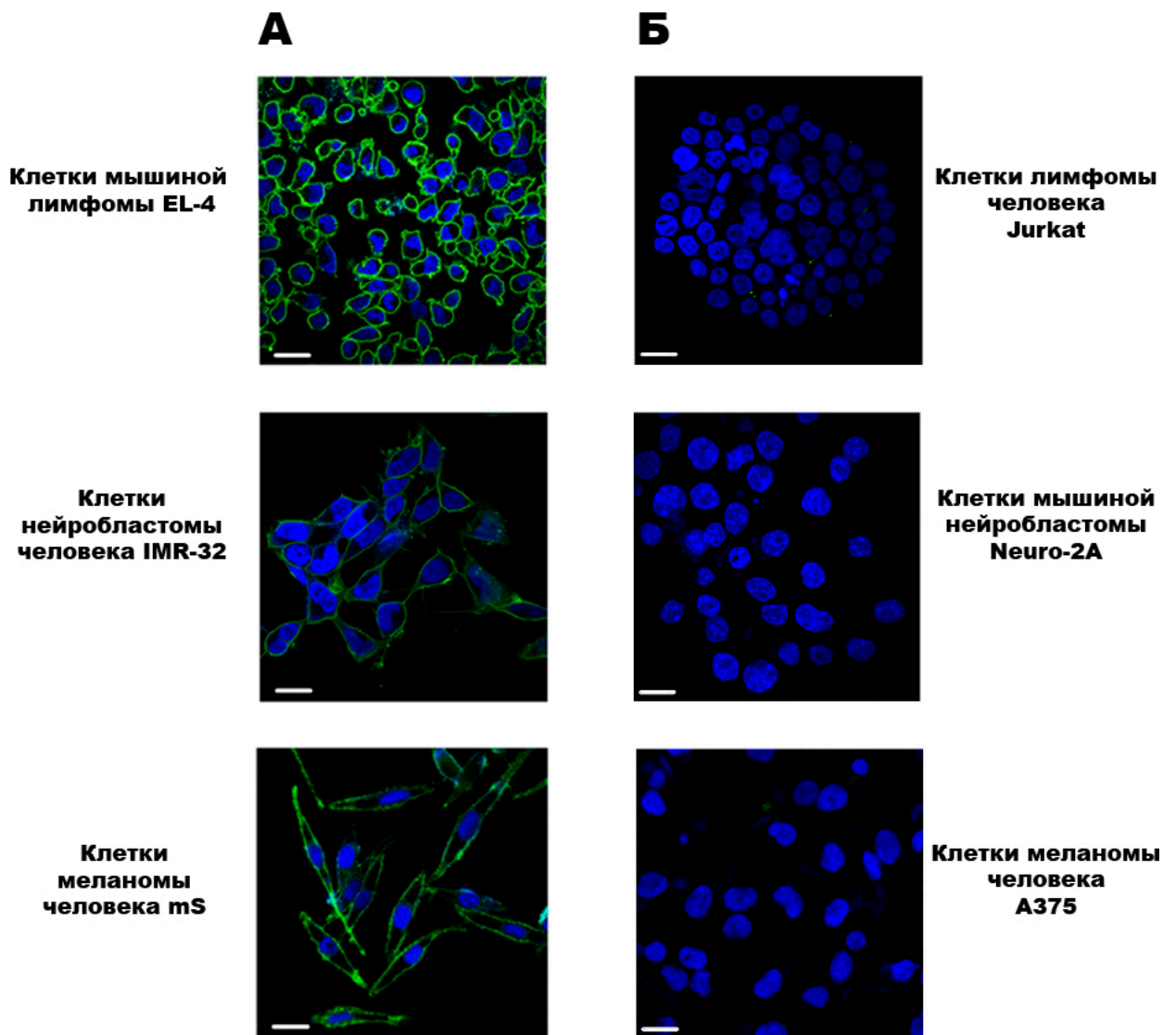


Рисунок 14. Экспрессия ганглиозида GD2 клетками линий EL-4, IMR-32, mS, Jurkat, Neuro-2a, и A375. Данные конфокальной микроскопии. Окрашивание клеток антителами 14G2a, конъюгированными с флуоресцентным красителем AlexaFluor488. Зеленым обозначена флуоресценция AlexaFluor488-меченых антител 14G2a. Ядра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

Для подтверждения результатов, полученных цитометрическими методами, по подбору GD2-позитивных и GD2-негативных опухолевых линий было проведено иммуноцитохимическое окрашивание выбранных клеточных линий анти-GD2-мАт с дальнейшей визуализацией при помощи конфокальной микроскопии (Рисунок 14). После стандартной процедуры окрашивания живых клеток антителами, ядра докрашивали красителем Hoechst 33342. Как видно из Рисунка 14 А после инкубации с анти-GD2-мАт клетки линий EL-4, IMR-32 и mS характеризуются интенсивной флуоресценцией, что говорит о присутствии на их поверхности ганглиозида GD2. Также из представленных изображений видно, что флуоресценция меченых антител 14G2a в случае клеток линии EL-4 выше, чем у линий mS и IMR-32. С учетом того, что детекция флуоресценции для этих клеток регистрировалась при одинаковых настройках прибора, можно сделать вывод о том, что экспрессия ганглиозида GD2 на поверхности клеток EL-4 максимальна в этих трех линиях. В случае окрашивания клеток линий Jurkat, Neuro-2A и A375 флуоресцентно мечеными антителами к GD2 изменения флуоресценции от изотопического контроля не наблюдалось. На основании этого, а также того, что были проведены аналогичные процедуры и использованы те же параметры усиления и детекции флуоресценции конфокального микроскопа, можно заключить, что клетки линий Jurkat, Neuro-2A и A375 являются GD2-негативными.

Аналогичные результаты в цитометрических и конфокальных экспериментах были получены в случае двойного окрашивания клеток (данные не представлены). В данном случае использовали немеченые GD2-специфичные антитела 14G2a и ME361. В этих экспериментах вводилась дополнительная стадия окрашивания клеток анти-видовыми FITC-мечеными антителами, а контролем выступали клетки, прошедшие те же процедуры, что и экспериментальные образцы, за исключением стадии окрашивания GD2-специфичными антителами, вместо этого к суспензии клеток был добавлен буфер. Данный контроль позволяет учесть вклад возможной неспецифической сорбции анти-видовых флуоресцентно-меченых антител на поверхности клеток.

Таким образом, двумя методами была проанализирована экспрессия ганглиозида GD2 на поверхности клеток нескольких клеточных линий. Эти линии, относящиеся к различным типам рака, были дифференцированы на GD2-позитивные и GD2-негативные. GD2-позитивные клеточные линии EL-4, mS и IMR-32 характеризуются высокой экспрессией ганглиозида GD2, при этом самый высокий уровень экспрессии наблюдается в клетках мышиной лимфомы EL-4. Результаты представленных экспериментов позволили выбрать адекватную клеточную модель для изучения эффектов GD2-специфичных антител и их фрагментов в последующих экспериментах.

4.1.2 Цитотоксические эффекты GD2-специфичных антител на опухолевых клеточных линиях

Перед тем, как приступить к оценке цитотоксических эффектов различных анти-GD2-мАт на клеточные линии был проведен анализ чистоты анти-GD2-мАт, использованных в работе. 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 (Рисунок 15), затем при помощи ионообменной HPLC на катионной колонке TSKgel SP-5PW (Tosoh Bioscience LLC) (см. Материалы и методы). Данный подход позволил получить чистую фракцию антител (Рисунки 16, 17).

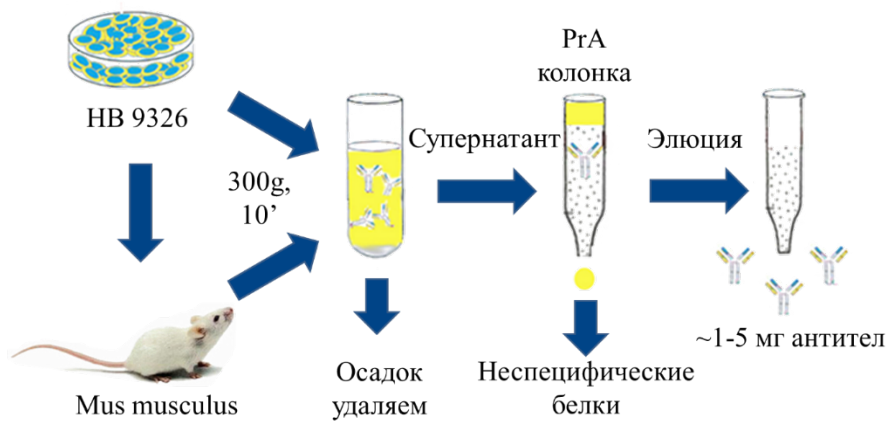


Рисунок 15. Схема выделения моноклональных антител ME361 из кондиционной среды гибридомы HB9326 и мышинных асцитов методом аффинной хроматографии.

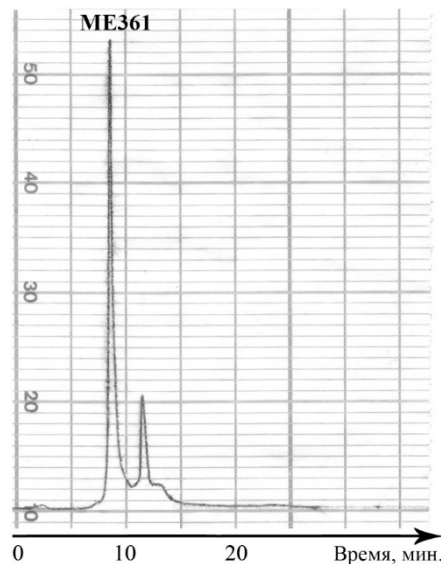


Рисунок 16. Аналитическая ионообменная хроматография антител ME361 после очистки на Protein A-колонке.

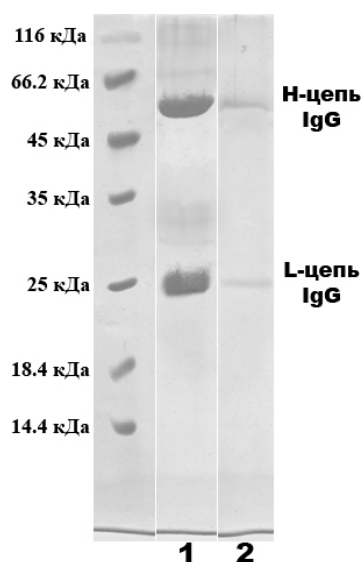


Рисунок 17. Электрофорез в ПААГ (12,5%) антител ME361 в восстанавливающих условиях. 1) Фракция антител ME361 после очистки на Protein A-колонке. 2) Фракция антител ME361 после очистки на Protein A-колонке + HPLC.

По результатам ПААГ-электрофореза чистота полученного белка после HPLC составляла более 95%, оценка чистоты антител проводилась в программе Image J (Рисунок 17). Электрофорез коммерческих антител 14G2a, различных фирм SantaCruz и Millipore, также подтвердил заявленную производителем чистоту более 95% (данные не представлены).

В растворе антител содержится азид натрия в концентрации от 0.02% до 0.1% для предотвращения контаминации. Известно, что азид натрия ингибирует АТФ-зависимые процессы и в зависимости от концентрации и типа клеточной линии может индуцировать либо апоптоз, либо некроз [192]. Максимальная используемая концентрация азид натрия, после добавления раствора антител клеткам составляла 1 мкг/мл. В среднем эта концентрация не превышала 0,1 мкг/мл. Влияние различных концентраций азид натрия (до максимальной 1 мкг/мл) на клетки GD2-позитивных линий было проверено в МТТ-тесте (Рисунок 18).

Как видно из Рисунка 18, влияния на клетки выбранных концентраций азид натрия не наблюдается. Представленные результаты говорят о том, что в нашем распоряжении имеются чистые белковые фракции антител, а присутствующий в их растворе азид натрия (в используемых концентрациях) не влияет на жизнеспособность клеток и, следовательно, в дальнейших исследованиях действия антител на GD2-негативные и GD2-позитивные клетки можно связывать только с эффектами самих антител, а не белковых примесей или дополнительных компонентов раствора.

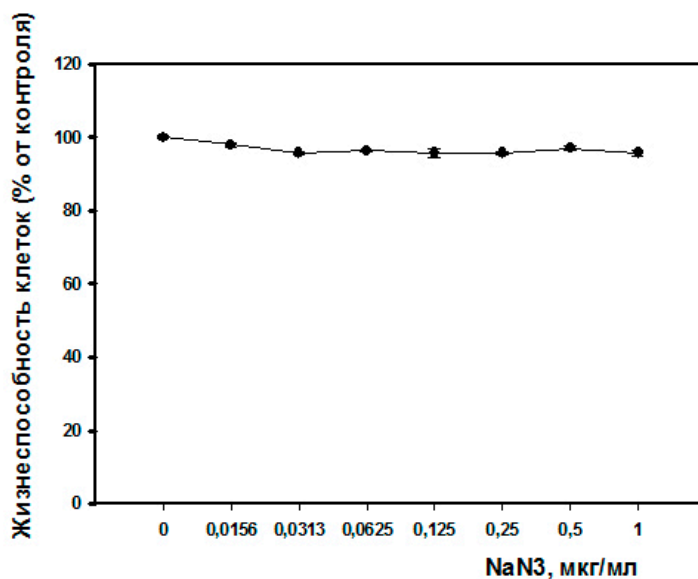


Рисунок 18. МТТ-тест. Оценка влияния азидата натрия на жизнеспособность клеток EL-4. Инкубация клеток с различными концентрациями азидата натрия в течение 72 ч. Каждая точка представляет собой среднее значение жизнеспособности клеток, полученное в трех повторах каждой точки.

Для того чтобы проанализировать влияние GD2-специфичных антител на опухолевые клетки, был проведен ряд классических функциональных тестов. Цитотоксические эффекты GD2-специфичных моноклональных антител на выбранные GD2-позитивные и GD2-негативные клеточные линии были исследованы с помощью двух различных моноклональных антител 14G2a и ME361. Было обнаружено, что после 24-часовой инкубации опухолевых клеток с GD2-специфичными моноклональными антителами, 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. Указанные морфологические изменения были наиболее ярко выражены для клеточных линий EL-4 и mS (Рисунок 19 Б). При этом использованные GD2-специфичные моноклональные антитела 14G2a и ME361 не влияли на морфологию GD2-негативных клеточных линий Jurkat, Neuro-2A и A375 (Рисунок 19 А).

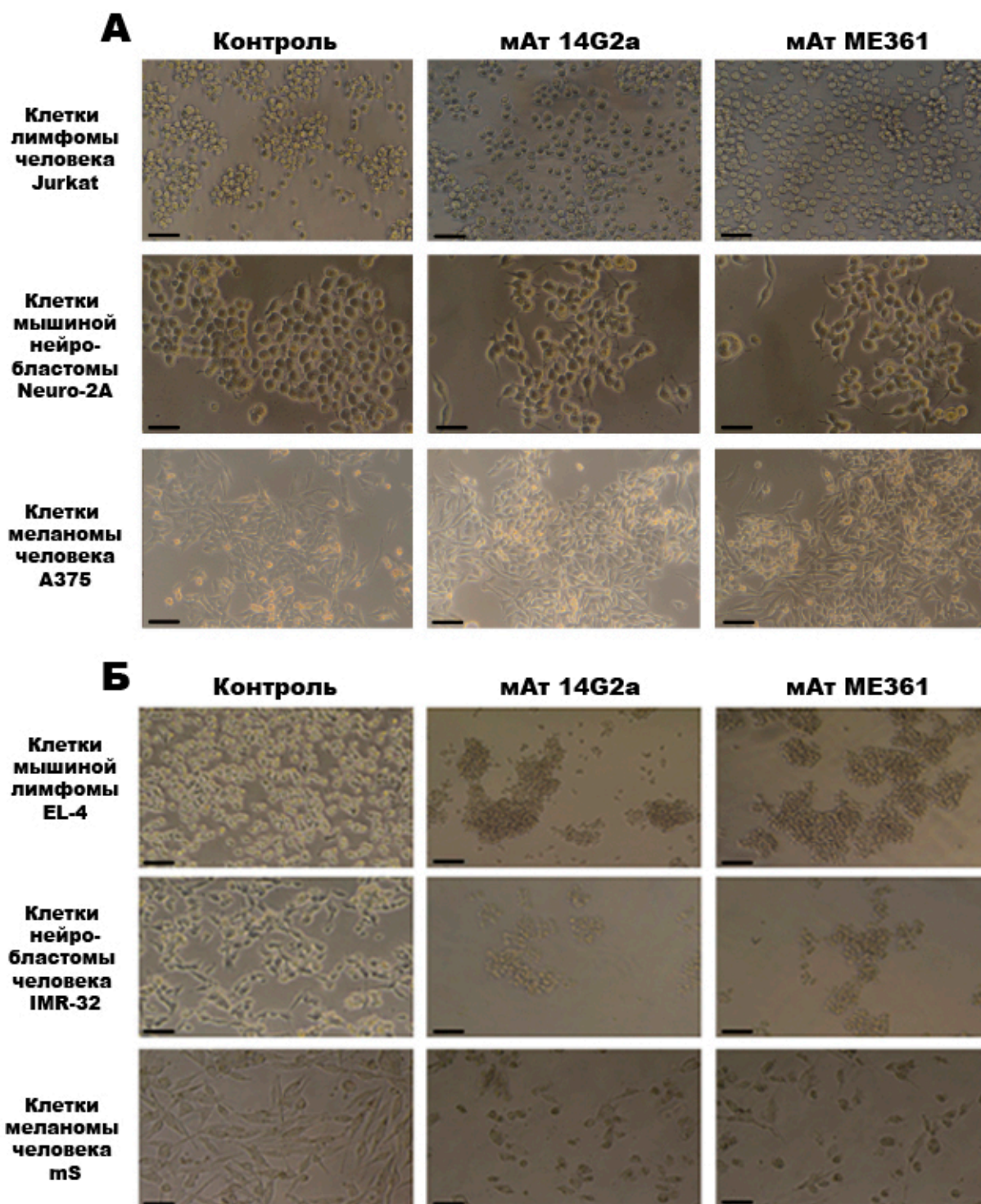


Рисунок 19. Цитотоксические эффекты двух типов GD2-специфичных антител 14G2a и ME361. А) Фазово-контрастные изображения клеток GD2-негативных клеточных линий Jurkat, Neuro-2A, A375 и Б) GD2-позитивных клеточных линии EL-4, IMR-32 и mS через 24 ч. инкубации с GD2-специфичными антителами (500 тыс. клеток /образец, 14G2a и ME361, 5 мкг/мл) или с PBS. Отрезок шкалы - 50 мкм.

Также был исследован уровень фрагментации ДНК в опухолевых клетках после инкубации с GD2-специфичными моноклональными антителами. Для этого клетки окрашивали

ДНК-связывающим агентом – пропидум иодидом (PI), как описано в разделе Материалы и методы. Флуоресцентный краситель пропидум иодид является интеркалятором ДНК, поэтому интенсивность его флуоресценции прямо пропорциональна количеству ДНК в клетке. На гистограммах распределения интенсивности флуоресценции PI можно отчетливо выделить пик с высокой интенсивностью флуоресценции, соответствующий живым клеткам, и пик с низкой интенсивностью флуоресценции, соответствующий клеткам с фрагментированной ДНК, содержащим меньшее количество ДНК по сравнению с живыми клетками. Процент клеток под гиподиплоидным пиком для трех протестированных GD2-положительных опухолевых клеточных линий EL-4, mS и IMR-32 увеличивался после инкубации с GD2-специфичными моноклональными антителами по сравнению с интактными клетками. После 24-х часов инкубации с двумя различными типами GD2-специфичных антител 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 (Рисунок 20 Б). 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. Для клеток линии mS, проинкубированных с антителами 14G2a и ME361, эти значения составляли 3.2 ± 0.4 и 2.3 ± 0.5 соответственно (Рисунок 20 Б). Важно отметить, что антитела 14G2a и ME361 не увеличивали долю клеток с фрагментированной ДНК после их инкубации с клетками линий Jurkat, Neuro-2A и A375 (Рисунок 20 А). Эти результаты говорят о том, что по данным PI-теста GD2-специфичные моноклональные антитела не оказывают воздействия на GD2-негативные опухолевые клетки.

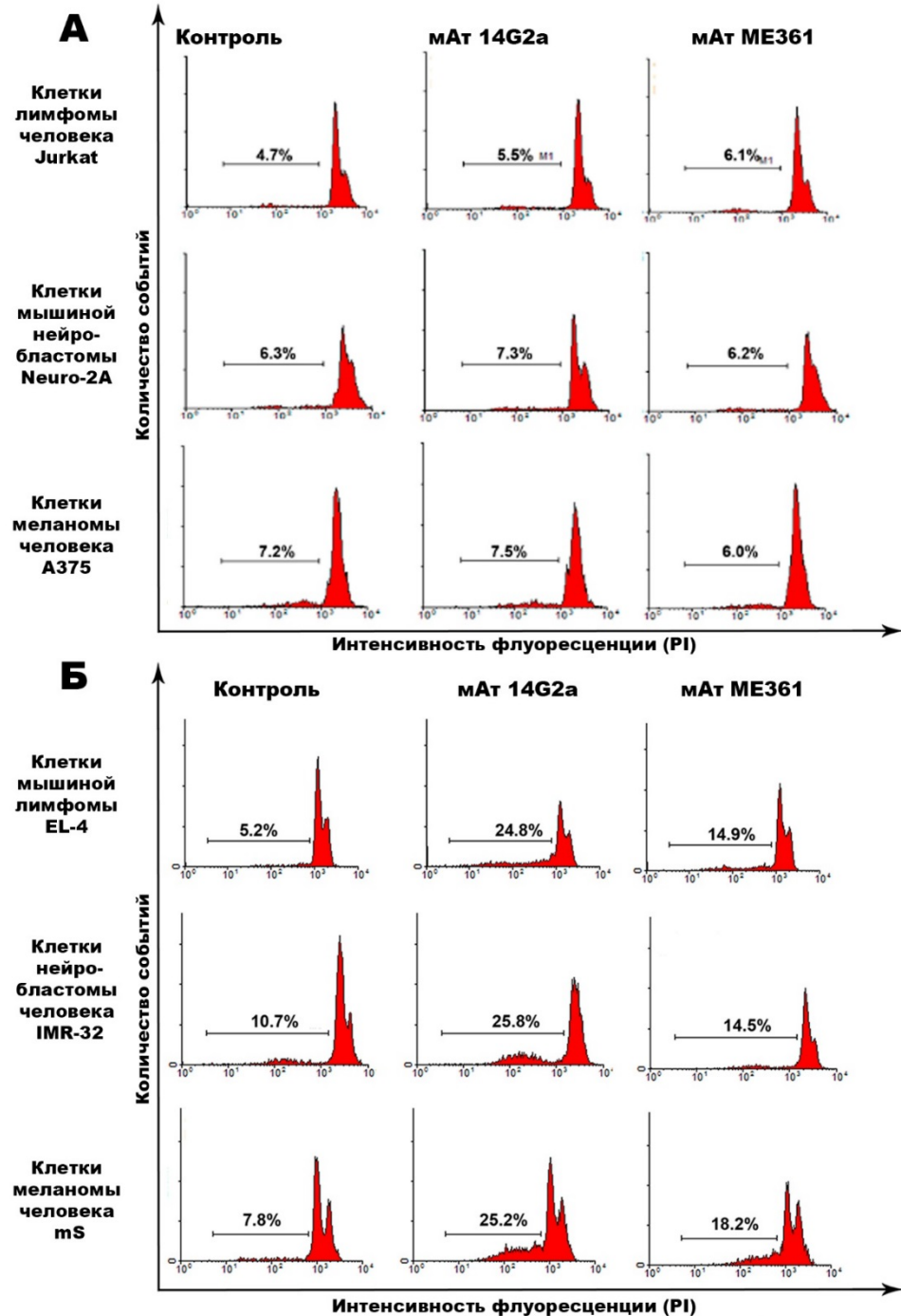


Рисунок 20. Цитотоксические эффекты двух типов GD2-специфичных антител 14G2a и ME361. PI-тест. Анализ уровня фрагментации ДНК клеток GD2-негативных клеточных линий Jurkat, Neuro-2A, A375 (А) и GD2-позитивных клеточных линии EL-4, IMR-32 и mS (Б) после инкубации (24 ч) с GD2-специфичными антителами 14G2a и ME361 (500 тыс. клеток /образец, 5 мкг/мл). Маркером обозначена доля клеток с фрагментированной ДНК. Представлены результаты репрезентативного эксперимента. Было проведено не менее 3 экспериментов.

При помощи МТТ-теста также была исследована жизнеспособность опухолевых клеток в присутствии различных концентраций GD2-специфичных моноклональных антител. МТТ-тест является колориметрическим методом, оценивающим уровень активности митохондрий и

позволяющим опосредованно определять жизнеспособность клеток. Как показано на Рисунке 21, GD2-специфичные антитела значительно снижали жизнеспособность GD2-позитивных клеточных линий EL-4, mS и IMR-32, практически не оказывая влияния на GD2-негативные клеточные линии Neuro-2A, A375 и Jurkat. Следует отметить, что антитела 14G2a проявили более сильные цитотоксические эффекты на GD2-позитивных клеточных линиях (Рисунок 21 А) по сравнению с антителами ME361 (Рисунок 21 Б).

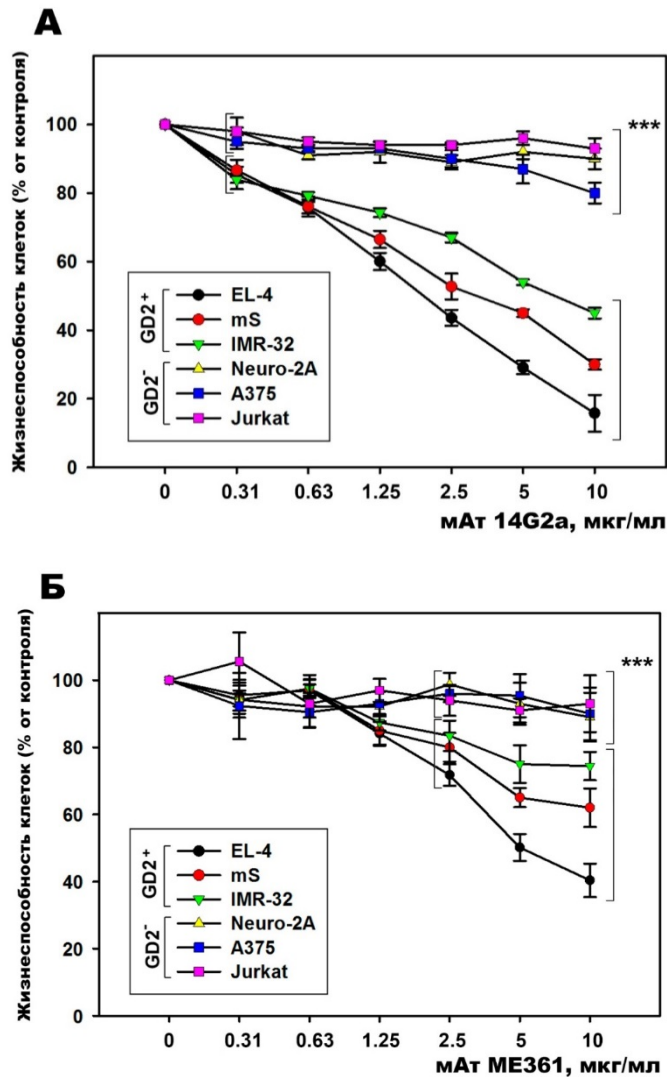


Рисунок 21. МТТ-тест. Сравнение влияния GD2-специфичных антител на жизнеспособность клеток GD2-позитивных (EL-4, IMR-32, mS) и GD2-негативных клеточных линий (Neuro-2A, A375, Jurkat). А – Инкубация клеток с различными концентрациями антител 14G2a в течение 72 ч. Б - Инкубация клеток с различными концентрациями антител ME361 в течение 72 ч. Каждая точка представляет собой 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).

После 72-часовой инкубации клеток с наибольшей из использованных концентраций антител 14G2a (10 мкг/мл), самый сильный эффект наблюдался для клеток лимфомы EL-4, которые характеризуются гиперэкспрессией ганглиозида GD2. Как видно из Рисунка 21 А жизнеспособность клеток EL-4 снизилась более чем на 80%, а жизнеспособность клеток mS и IMR-32 снизилась на 60-70%. Из Рисунка 21 Б видно, что цитотоксический эффект антител ME361 был выражен слабее, однако также оказался существенным. Уровни жизнеспособности GD2-позитивных 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.

В данном разделе работы была выбрана оптимальная клеточная модель GD2-позитивных и GD2-негативных линий. В каждую группу вошли 3 клеточные линии, представляющие разные типы рака. Было доказано, что GD2-специфичные антитела 14G2a и ME361, использованные в работе, представляют чистые белковые фракции, а присутствующий в растворе антител азид натрия в выбранных концентрациях не влияет на жизнеспособность клеток, что позволило связывать полученные в дальнейших экспериментах эффекты на клеточных линиях исключительно с действием антител. С использованием нескольких методов было изучено цитотоксическое действие анти-GD2-мАт на GD2-позитивные и GD2-негативные клеточные линии. 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. Воздействия даже высоких концентраций различных GD2-специфичных антител на GD2-негативные опухолевые клеточные линии не обнаруживалось. Из представленных результатов можно сделать вывод, что цитотоксические эффекты анти-GD2-мАт характеризуются очень высоким уровнем, имеют специфическое действие исключительно на клетки, несущие GD2, характерны для раковых клеток различного происхождения и зависят от уровня экспрессии GD2. Эти данные позволяют обоснованно приступить к получению фрагментов GD2-специфичных антител и исследованию их функциональной активности.

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

Существует два подхода в получении фрагментов антител – создание рекомбинантных форм и энзиматическое получение из полноразмерных антител. Первый вариант выглядит более предпочтительно в силу нескольких причин. Методы выделения и очистки рекомбинантных фрагментов значительно проще и удобнее многоэтапной работы их получения из антител. Энзиматическое получение фрагментов антител требует последовательной работы с эукариотическими клетками, затем с животными, с последующим выделением и очисткой антител, а также их ферментативным расщеплением для получения фрагментов необходимого размера. Кроме того, варианты фрагментов антител, полученных энзиматическим путем, сильно ограничены, в то время как с помощью молекулярно-генетических методов можно создать различные фрагменты как природного, так и полностью искусственного происхождения. Кроме того, себестоимость получения рекомбинантных фрагментов антител значительно ниже себестоимости энзиматического расщепления полноразмерных антител.

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

Эти фрагменты являются наименьшими стабильными фрагментами моноклональных антител. Получение scFv-фрагментов позволит, с одной стороны, дополнить представления о фундаментальной роли опухлеассоциированного ганглиозида GD2 в процессе запуска гибели опухолевых клеток. С другой стороны, благодаря особенностям своей структуры и преимуществам по сравнению с моноклональными антителами (и рядом более крупных фрагментов антител), таким как меньший размер, что позволяет им эффективнее проникать вглубь солидных опухолей, а также отсутствие Fc-фрагмента, что обуславливает снижение ряда побочных эффектов, связанных с активацией иммунной системы, открываются перспективы практического использования scFv-фрагментов. Модифицированные scFv-фрагменты GD2-специфичных антител 3F8 могут послужить основой для низкотоксичных высокоэффективных адресных противоопухолевых препаратов для терапии GD2-позитивных онкологических заболеваний.

Известно, что scFv-фрагменты mAb, как правило, обладают более низкой аффинностью связывания своих лигандов по сравнению с полноразмерными моноклональными антителами и, в связи с этим, в первую очередь используются для диагностических целей. Однако в случае ганглиозида GD2, данный недостаток может являться преимуществом, так как высокая

аффинность GD2-связывающих лигандов может определять преимущественно периферическое связывание GD2 и индукцию клеточной гибели в клетках, расположенных на периферии опухоли. А если принимать во внимание тот факт, что клетки многих солидных опухолей под воздействием препаратов моноклональных антител начинают активно сбрасывать таргетный антиген и тем самым уходить от терапии (как в случае CD20-Rituximab [193]), то сниженная аффинность scFv-фрагментов позволит воздействовать на большее число опухолевых клеток. Для конструирования scFv-фрагмента были выбраны GD2-специфические антитела 3F8. Выбор именно этого антитела был обусловлен его высокой аффинностью к GD2 ($KD = 5 \text{ nM}$ [32]), отсутствием кросс-реактивности с другими ганглиозидами, а также наличием в научной литературе нуклеотидной и аминокислотной последовательностей этого антитела. Созданная нами конструкция scFv-фрагмента данных антител включает в себя пять молекул цистеина, при этом четыре из них присутствовали в исходной последовательности антитела, а один остаток цистеина был введен дополнительно. Неспаренный цистеин на С-конце scFv-фрагмента даст возможности для его дальнейшей модификации - с получением мультимерных форм, сайт-направленной модификации, пришивки к наноконструкциям или липосомам, а также прямой конъюгации с более активными цитотоксическими агентами

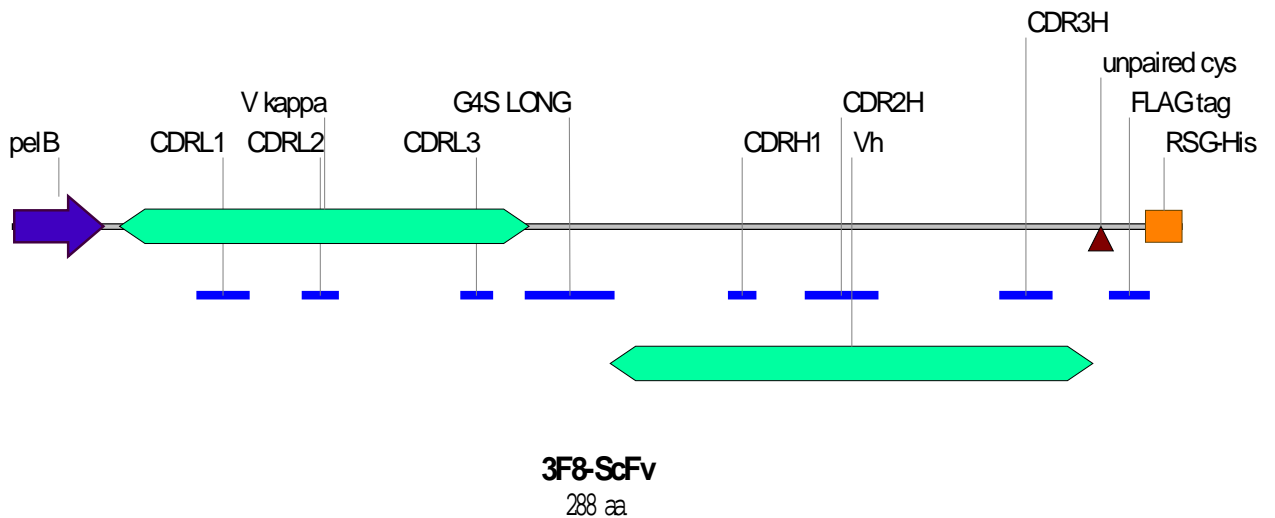


Рисунок 22. Структура разработанного scFv-фрагмента.

Конструкции для получения растворимых scFv-фрагментов были разработаны на основе вектора pET22b+ с добавлением сигнальной последовательности pelB, которая определяет секрецию белков после индукции непосредственно в периплазматическое пространство (См. Материалы и методы). Конструкция представляет собой фрагменты антител (VL и VH), содержащие лидерный пептид, а также два тэга – FLAG и His₆, которые позволяют эффективно очищать рекомбинантные белки с использованием Ni-NTA-агарозы (Рисунок 22). Известно, что периплазматическая секреция значительно облегчает выделение и очистку рекомбинантных scFv-фрагментов антител и позволяет избежать проблем, связанных с образованием телец

включения. В периплазматическом пространстве присутствуют специализированные шаперонные структуры, а также соблюдаются подходящие окислительно-восстановительные условия для формирования дисульфидных связей.

Прокариотическая экспрессия представляет собой удобную систему белкового синтеза. В качестве продуцента scFv-фрагментов антител 3F8 были выбраны клетки *E. coli*, ввиду максимальной доступности и проработанности генно-инженерных методов для данного организма, по сравнению с любыми другими микроорганизмами. Плазмидную ДНК трансформировали в несколько штаммов *E. Coli*: HMS174(DE3)pLysS, Rosetta-gami B(DE3)pLysS, RosettaBlue(DE3)pLysS и Rosetta 2(DE3)pLysS. Затем была проведена индукция и подбор оптимального штамма и условий экспрессии, варьировались температура, время и концентрация индуктора IPTG. При сравнении результатов проведенной индукции нами был выбран штамм HMS174(DE3)pLysS, поскольку он характеризовался максимальной экспрессией целевого белка (данные не представлены). Наибольший выход рекомбинантных scFv-фрагментов (5 мг/л) был получен при культивировании клеток до индукции не менее двух часов при комнатной температуре при интенсивном покачивании (250 об/мин), с последующим добавлением IPTG (до конечной концентрации 1 мМ) и выращиванием культуры на протяжении 16 часов при 37 °С.

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 (Рисунок 23).

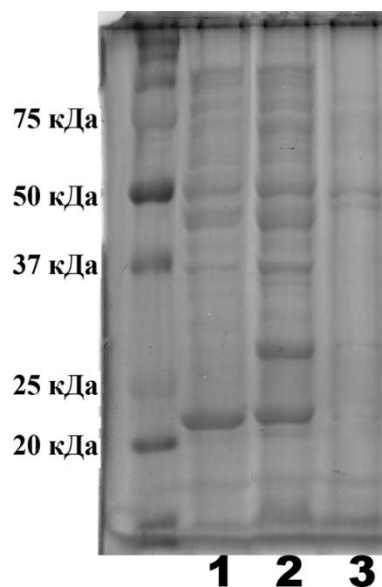


Рисунок 23. Электрофорез в ПААГ (12,5%) лизатов HMS174(DE3)pLysS в восстанавливающих условиях. 1) Тотальная фракция белка не индуцированных клеток, выделенная в денатурирующих условиях. 2) Тотальная фракция белка индуцированных клеток, выделенная в денатурирующих условиях. 3) Периплазматическая фракция белка индуцированных клеток.

Из анализа представленной электрофореграммы видно, что в лизате индуцированных клеток присутствует дополнительная полоса белка с молекулярной массой порядка 28 кДа (Рисунок 23.2), который, скорее всего, является искомым scFv-фрагментом моноклонального антитела 3F8, поскольку ожидаемая масса сконструированного фрагмента составляет порядка 28 кДа, после отрезания лидерного пептида. К сожалению, его периплазматическая экспрессия оказалась на слишком низком уровне (Рисунок 23.3). 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, последующие операции проводились в денатурирующих условиях в 8М мочеvine.

Исследование функциональных свойств синтезированных scFv-фрагментов возможно только при наличии высокоочищенного препарата. Так как экспрессируемый scFv-фрагмент содержал гистидиновую метку, то его последующая очистка из лизата осуществлялась при помощи Ni-NTA агарозы. Благодаря структуре NTA и его жесткой связи с ионами никеля, His-меченные белки могут быть элюированы с высоким выходом и достаточно высокой степенью очистки. Оценку чистоты полученных scFv-фрагментов проводили методом ПААГ-электрофореза (Рисунок 24).

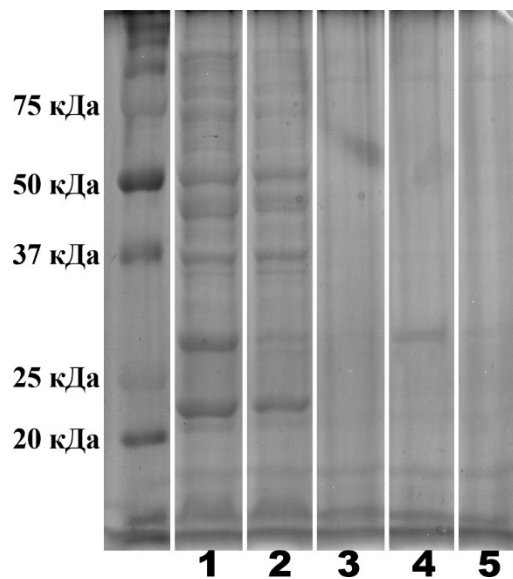


Рисунок 24. Афинная очистка scFv-фрагментов антител с использованием Ni-NTA агарозы, 12,5% ПААГ-электрофорез. 1) Тотальная фракция белка индуцированных клеток, выделенная в денатурирующих условиях. 2) Элюция 100 mM NaH_2PO_4 . 3) Элюция 10 mM Tris-HCl . 4) Элюция 8 М мочеvineй (pH 5.9). 5). Элюция 8 М мочеvineй (pH 4.5).

Как видно из Рисунка 24.4 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. Данный белок элюируется во фракции 8

М мочевины (рН 5.9, Рисунок 24.4), помимо этого следовые количества белка отмечаются также во фракции 8 М мочевины (рН 4.5, Рисунок 24.5). Суммарный выход scFv-фрагмента в данных условиях составляет порядка 10% от общего белка.

Для дополнительной характеристики выделенного белка был проведен вестерн-блот анализ с использованием His- и FLAG-специфичных антител (Рисунок 25), визуализация связывания осуществлялась с использованием Metal Enhanced DAB Substrate Kit. 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. При этом следует отметить, что связывания антител с фракцией не индуцированных клеток не наблюдалось (Рисунок 25.2). В данном эксперименте в качестве контроля был использован бычий сывороточный альбумин (Рисунок 25.3). Таким образом, можно сделать вывод о том, что секретируемый белок является искомым scFv-фрагментом моноклонального антитела 3F8.

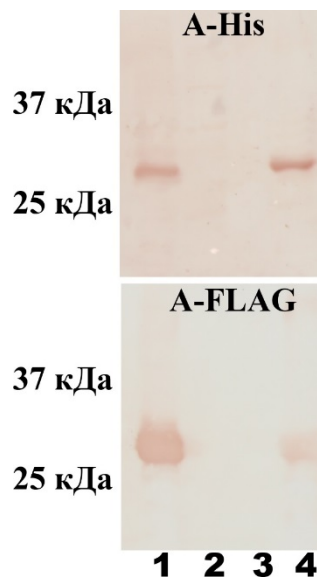


Рисунок 25. Вестерн-блот. 1) клеточный лизат индуцированной культуры, 2) клеточный лизат не индуцированной культуры, 3) бычий сывороточный альбумин, 4) очищенные с использованием Ni-NTA scFv-фрагменты. Инкубация 2 ч. Вторичные антитела anti-His 1:1000 (24 ч), anti-rabbit HRP 1:500 (1 ч), anti-FLAG 1:2000 (24 ч), anti-mouse HRP 1:12000 (1 ч). Визуализация с использованием Metal Enhanced DAB Substrate Kit.

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

4.1.4 Изучение связывающей способности полученных scFv-фрагментов

Связывающую способность scFv-фрагментов моноклональных антител проверяли методом иммуноферментного анализа (Рисунок 26 А), а также методами проточной цитофлуориметрии на различных GD2-позитивных клетках (Рисунок 26 Б). Иммуноферментный анализ позволяет качественно определять различные соединения, включая гликофинголипиды, в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Для проведения ИФА были использованы планшеты SPL medium binding, оптимально подходящие для нанесения в качестве подложки гликофинголипидов.

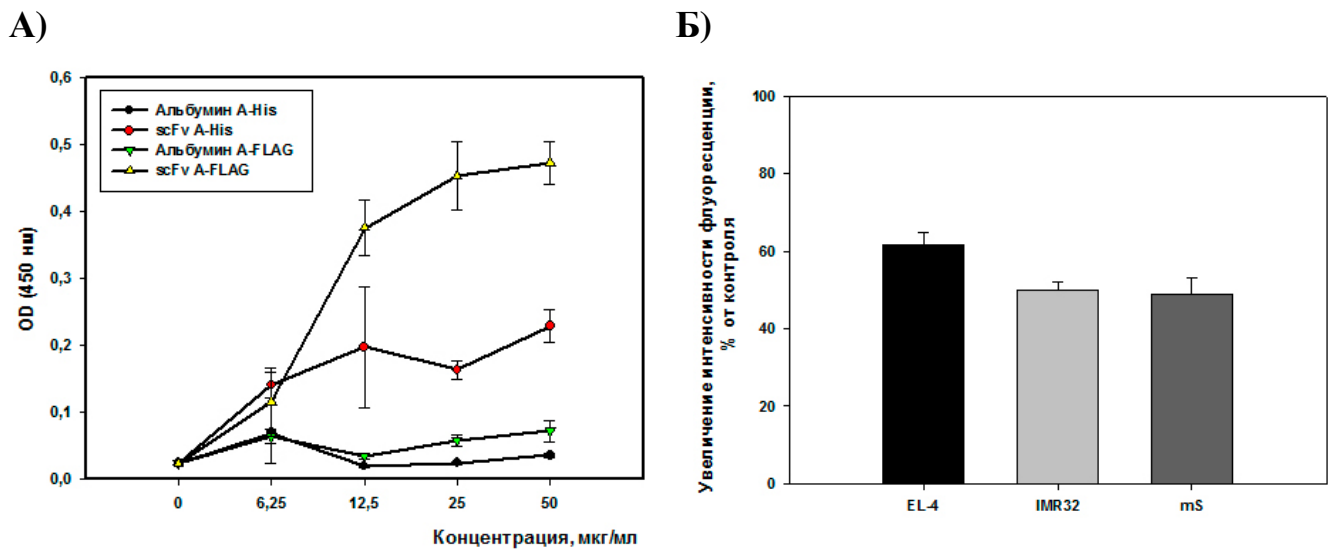


Рисунок 26. А) Прямой ИФА, по оси x – различные концентрации scFv-фрагментов антител 3F8 или BSA. Окрашивание антителами anti-His или anti-FLAG, с последующим окрашиванием антителовидовыми HRP-мечеными антителами. На подложке сорбированный ганглиозид GD2 (250 нг/лунка). Каждая точка в трёх повторах.

Б) Результаты поверхностного окрашивания клеток EL-4. Представлено отношение интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных GD2-специфичными scFv-фрагментами антител 3F8 к интенсивности флуоресценции контрольных клеток. Представлены результаты 3 независимых экспериментов.

Из представленных данных видно, что полученный рекомбинантный белок способен связывать ганглиозид GD2 и действительно является GD2-связывающим фрагментом антитела 3F8. В то же время значения связывания с GD2, полученные методами проточной цитометрии и ИФА у этого фрагмента не велики. Можно предположить несколько причин этому:

- 1) Сконструированный scFv-фрагмент является искусственно созданной структурой и, возможно, имеет отличный и не оптимальный сайт связывания с ганглиозидом GD2 по сравнению с исходными антителами 3F8. Такая возможность будет исследована методами

компьютерного моделирования, направленных на сравнение сайтов связывания с GD2 антител 3F8 и scFv.

2) Использованный рефолдинг денатурированного рекомбинантного белка мог привести к неправильной сборке scFv-фрагмента. Так, в его структуре содержится 5 остатков цистеина, возможно, что при фолдинге белка образовались неправильные S-S связи. Учитывая это, а также низкий выход реакции по рефолдингу белка, в дальнейшей работе будет проведен поиск оптимальных условий культивирования и индукции клеток для получения растворимой периплазматической экспрессии scFv-фрагментов.

3) Также возможно, что использованные методические подходы для оценки связывания scFv-фрагментов не оптимальны. Размеры ганглиозида и scFv-фрагмента не велики, а размеры “сэндвича” (анти-FLAG или анти-HIS, а также антивидовые HRP-меченые антитела) для определения их взаимодействия, наоборот, значительны. Стабильность такого комплекса как на подложке лунки ИФА, так и на поверхности клеток вызывает сомнения. В дальнейшей работе будут подобраны реактивы для уменьшения такого комплекса, наиболее правильным видится использование HRP- или FITC-меченых анти-FLAG(His)-Fab-фрагментов антител. Кроме того, может быть проведена реакция прямого мечения HRP или флуоресцентной меткой (предпочтительно сайт-направленно по неспаренному цистеину фрагмента) полученных фрагментов для оценки способности связывания ганглиозида GD2.

Таким образом, нами были получены рекомбинантные GD2-связывающие scFv-фрагменты, сконструированные на основе моноклональных антител 3F8, способные взаимодействовать с опухолеассоциированным ганглиозидом GD2. Был выбран продуцент, подобраны условия выделения, очистки и рефолдинга полученных фрагментов. Также было показано связывание полученных scFv-фрагментов антител 3F8 с ганглиозидом GD2 методами проточной цитометрии и ИФА. В то же время малые количества полученных после рефолдинга scFv-фрагментов не позволили провести анализ цитотоксических свойств этих фрагментов на GD2-позитивные опухолевые клетки. Работа в данном направлении будет продолжена.

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

Главной фундаментальной задачей следующего этапа данной работы являлось получение стабильных клеток гибридом, производящих моноклональные антитела к опухолеассоциированному ганглиозиду GD2. Необходимость этого заключается в том, что в научной литературе известно только 2 типа строго специфичных к ганглиозиду GD2 антител 14G2a и 3F8. При этом гибридома, продуцирующая антитела 14G2a, недоступна, также как и нуклеотидная последовательность этих антител. Использование дорогостоящих антител этого типа для получения фрагментов антител и/или экспериментов *in vivo*, требующих больших количеств антител, не представляется возможным. Антитела ME361, продуцируемые гибридомой HB9326, имеющейся в нашем распоряжении, позволяют провести все запланированные в исследовании эксперименты, что и будет представлено в следующем разделе работы. Однако эти GD2-специфичные антитела имеют кросс-реактивность к другому ганглиозиду – GD3, структурно очень схожего с GD2. Это обстоятельство не является значимым для данного исследования, поскольку в работе использованы клеточные линии не экспрессирующие GD3 (EL-4, IMR-32) или экспрессирующие его на низком уровне (mS) [183], но значительно ограничивает следующие возможные этапы применения фрагментов на основе антител ME361. Таким образом, создание собственной гибридомы, продуцирующей антитела к GD2, является непростой научной задачей в силу структурной схожести ряда ганглиозидов, но актуальным вопросом, как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения. Полученные антитела могут стать удобным инструментом для изучения цитотоксических свойств GD2-специфичных антител и их фрагментов, а также могут быть использованы для получения различных рекомбинантных форм – фрагментов антител, химерных и гуманизированных антител и т.д.

Для реализации поставленной задачи был использован адаптированный метод классической гибридомной технологии [67]. 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 KLN-модифицированные аналоги. Как отмечалось ранее, основным преимуществом пептидов по сравнению с ганглиозидом GD2 является повышенная иммуногенность. Данный пептид был получен методом твердофазного синтеза с последующей KLN-модификацией: *14G2a-94L* – RCNPNMEPPRCWAAEGD.

Гемоцианин улитки является дыхательным пигментом из группы металлопротеинов. Известно, что фукозил-GM1, ковалентно связанный с гемоцианином улитки, используемым в качестве носителя, в присутствии адъюванта QS-21, способен вызвать иммунный ответ с

продукцией высокоспецифичных антител к ганглиозидам [194]. Таким образом, полученные соединения предположительно обладают повышенной иммуногенностью в сравнении с чистым GD2 и, следовательно, при иммунизации лабораторных мышей линии BALB/c, теоретически должны вызывать усиленный и стабильный ответ с образованием GD2-специфичных антител.

Несмотря на схожую пространственную структуру полученных GD2-мимикрирующих пептидов и ганглиозида GD2 эти соединения имеют разную природу. Поэтому требовалось оценить возможность связывания GD2-мимикрирующих пептидов и GD2-специфических антител, что позволило бы сделать вывод о возможности использования таких пептидов в качестве иммуногенов. Оптимальным методом решения поставленной задачи являлся иммуноферментный анализ.

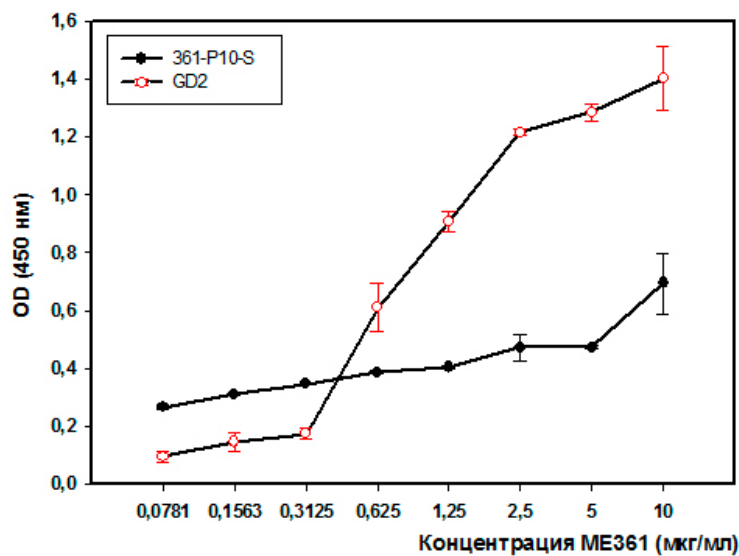


Рисунок 27. Прямой ИФА, антитела ME361, вторичные антитела anti-mouse-HRP 1:6000. На подложке пептид 14G2a-94L (500 нг/лунка) или GD2 (250 нг/лунка). Каждая точка в трёх повторах.

Как видно из графика на Рисунке 27, GD2-специфические антитела способны связываться с GD2-мимикрирующими пептидами, что свидетельствует в пользу того, что они могут быть использованы для индукции иммунного ответа с продукцией GD2-специфичных антител. Различия в значениях OD по сравнению с чистым GD2 обусловлены более высокой степенью сродства антител к ганглиозиду GD2.

В качестве объекта для иммунизации были выбраны лабораторные мыши линии BALB/c. Они хорошо охарактеризованы генетически, имеют быстрый цикл развития, и являются стандартом для получения гибридом.

Была проведена четырёхкратная иммунизация лабораторных мышей с последующим слиянием выделенных спленоцитов и клеток миеломы X63 в полиэтиленгликоле с получением клеток гибридомы (см. Материалы и методы). Оценку продукции GD2-специфичных антител

после иммунизации GD2-мимикрирующими пептидами, а также их KLH-модифицированными аналогами производилась при помощи иммуноферментного анализа (Рисунок 28):

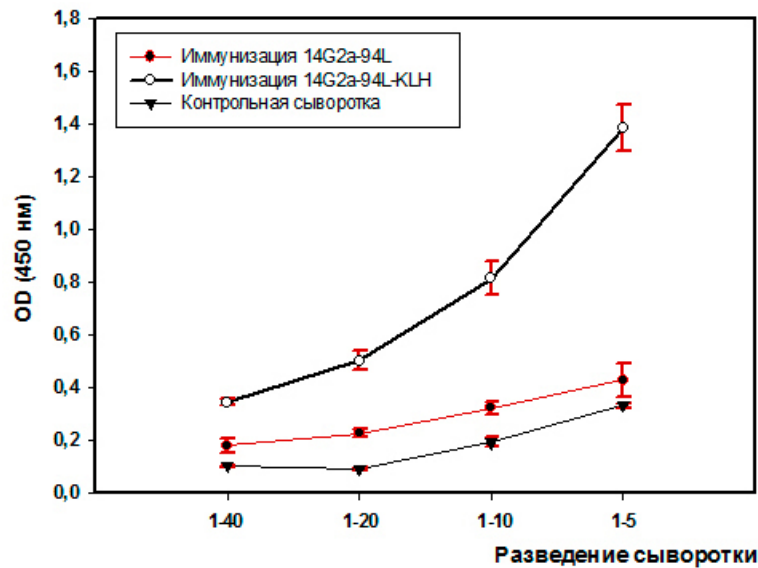


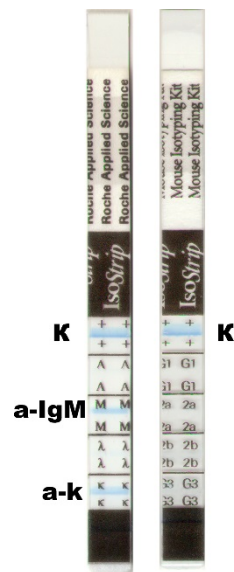
Рисунок 28. Прямой ИФА, на подложке ганглиозид GD2 (250 нг/лунка). Сыворотки получены после четырехкратной иммунизации пептидами 14G2a-94L и 14G2a-94L-KLH в полном адьюванте Фрейнда. Контроль – сыворотка, полученная от интактной мыши. Вторичные антитела anti-mouse-HRP 1:6000. Каждая точка в трёх повторах.

Как видно из графика, представленного на Рисунке 28, модификация ганглиозид-мимикрирующих пептидов при помощи гемоцианина улитки действительно позволила в несколько раз усилить иммунный ответ с образованием GD2-специфичных антител по сравнению с не модифицированными пептидами. Соответственно, именно спленоциты мышей, иммунизированных GD2-мимикрирующими пептидами, модифицированными гемоцианином улитки, были использованы для слияния с клетками миеломы X63. Отбор клонов производился методом последовательных лимитирующих разведений. Изотипирование полученных антител осуществлялось при помощи IsoStrip Isotyping Kit (Santa Cruz, США), который содержит латексные микрочастицы, несущие anti-mouse каппа и anti-mouse лямбда антитела, а также сорбированные на нитроцеллюлозной мембране goat anti-mouse антитела против IgG, IgM и IgA, каппа и лямбда лёгких цепей. При смешивании микрочастиц с раствором образца, за счет капиллярных сил происходит подъём микрочастиц по мембране и соответствующие иммунохимические реакции, визуализация которых позволяет сделать вывод о конкретном изотипе исследуемого антитела в образце.

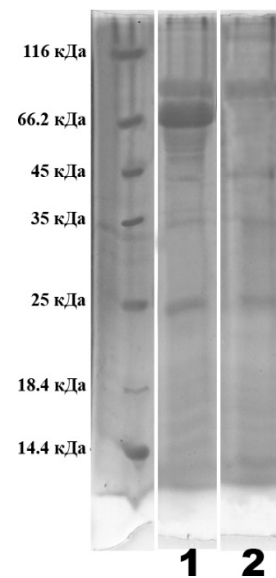
Исходя из сравнения аффинности полученных антител, продуцированных различными клонами, при помощи иммуноферментного анализа (данные не представлены) были выбраны наиболее оптимальные по ряду характеристик гибридомы, продуцирующие антитела, связывающие ганглиозид GD2. На данном этапе в работу были взяты клетки гибридомы,

продуцирующие антитела, обозначенные как 9P-L1. Изотипирование этих антител показало, что они относятся к IgM классу (Рисунок 29 А). Антитела 9P-L1 проявили способность связывания с Protein A, однако для получения чистой фракции антител потребовалась дополнительная хроматографическая очистка (Рисунок 29 В) с использованием гель-фильтрации (подробнее см. Материалы и методы). Использование хроматографии позволило получить фракции антител 9P-L1 с чистотой порядка 80% (Рисунок 30 Б), что было показано при помощи ПААГ-электрофореза.

А)



Б)



В)

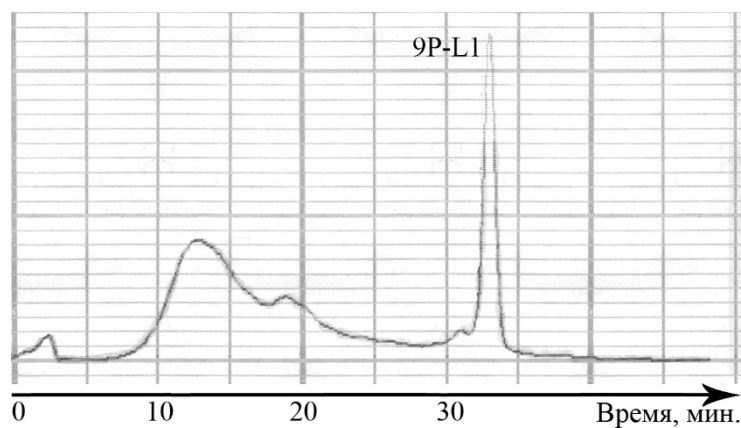


Рисунок 29. А). Результаты изотипирования при помощи IsoStrip Isotyping Kit. Б). ПААГ-электрофорез (10%) антител 9P-L1 в восстанавливающих условиях: 1). Фракция антител 9P-L1 после очистки на Protein A колонке. 2). Фракция антител 9P-L1 после последующей очистки на HPLC. В). Аналитическая гель-фильтрационная хроматография антител 9P-L1.

Полученные антитела 9P-L1 обладают хорошей GD2-связывающей способностью при сравнении с моноклональными антителами ME361, что было показано в ходе прямого иммуноферментного анализа с ганглиозидом GD2 (Рисунок 30). Также полученные антитела

способны эффективно связываться с ганглиозидом GD2 опухолевых клеток линии мышинной лимфомы EL-4 (Рисунок 31 А).

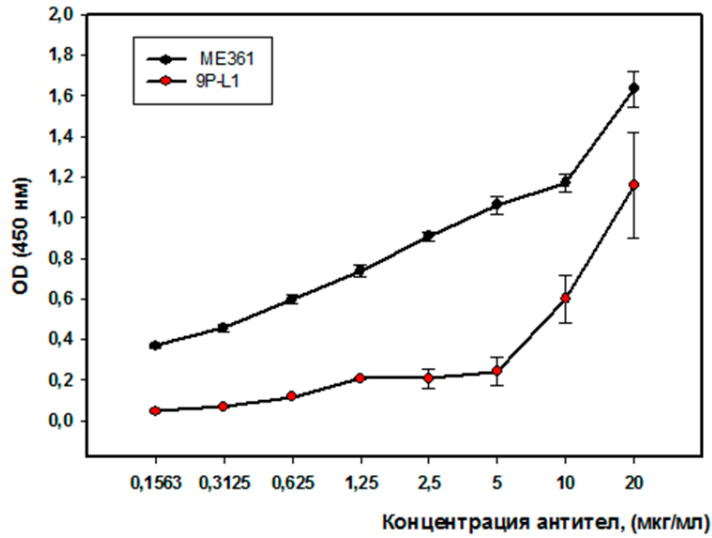


Рисунок 30. Прямой ИФА. Различные концентрации антител 9P-L1 и ME361 вторичные антитела anti-mouse-HRP (fab-specific) 1:6000. На подложке ганглиозид GD2 (250 нг/лунка). Каждая точка в трёх повторах.

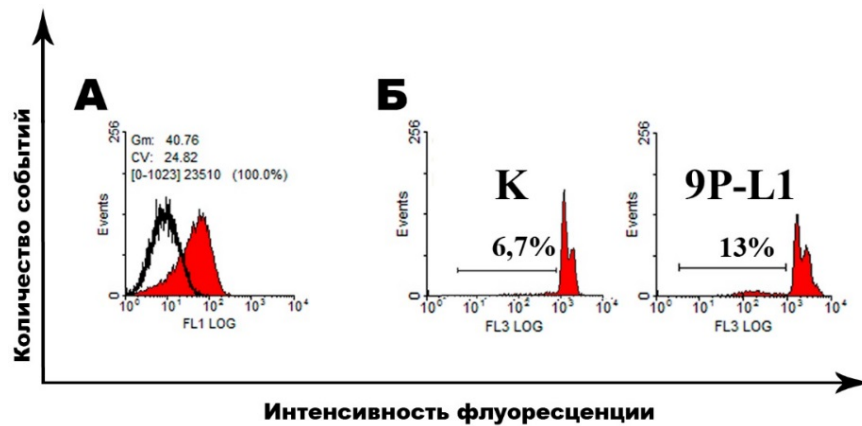


Рисунок 31. А) Цитометрические измерения клеток EL-4, окрашенных GD2-специфичными антителами 9P-L1, вторые антитела anti-mouse fab-specific-FITC (Timp 1:2000). Пик, обозначенный цветом, отражает флуоресценцию клеток, окрашенных GD2-мAb, контур – пик контрольных клеток, окрашенных изотипическими антителами. Представлены результаты репрезентативного эксперимента. Было проведено как минимум 3 эксперимента. б) 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). Маркером обозначена доля клеток с фрагментированной ДНК. Представлены результаты репрезентативного эксперимента. Было проведено как минимум 3 эксперимента.

Интересно отметить тот факт, что 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 (Рисунок 31 Б), что подтверждает общую закономерность, заключающуюся в индукции гибели GD2-позитивных опухолевых клеток под действием различных GD2-специфичных антител.

Важным этапом работы по оценке 9P-L1 являлся анализ их кроссреактивности с другими ганглиозидами. Как было указано выше, 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 изучения кроссреактивности полученных нами антител 9P-L1 нами был использован метод иммуноферментного анализа (Рисунок 32).

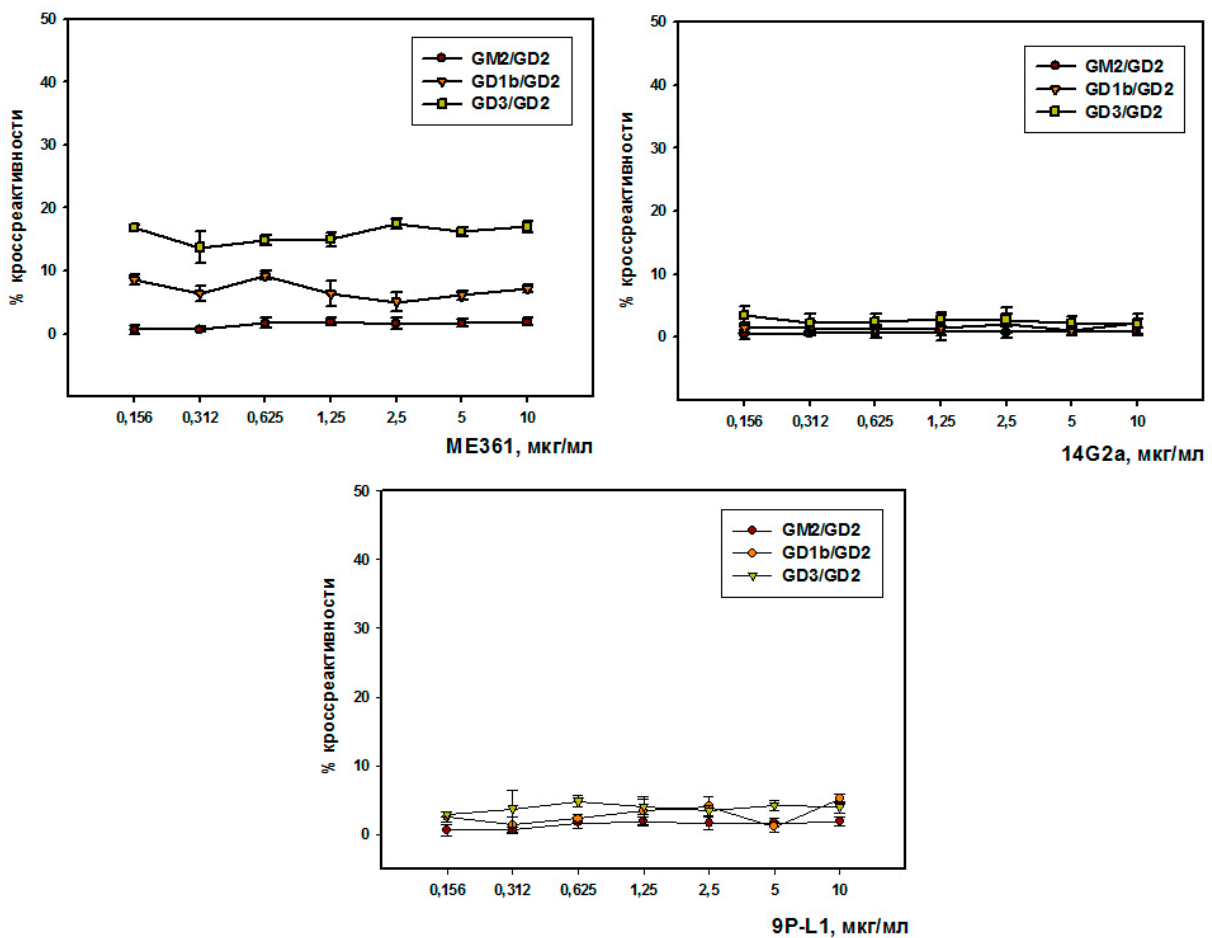


Рисунок 32. Оценка кросс-реактивности различных GD2-специфичных антител с ганглиозидами GM2, GD1b и GD3 по результатам ИФА. Наносили различные разведения антител 14G2a, ME361 и 9P-L1. Антивидовые HRP-меченые анти-Fab-специфичные антитела (1:6000). На подложке 250 нг/лунка различных ганглиозидов. % кросс-реактивности 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. Каждая точка в трёх повторах.

Как видно из представленных графиков, антитела ME361 обладают значимой кросс-реактивностью с ганглиозидом GD3 составляющей около 15% от связывания с GD2. Для антител 14G2a и 9P-L1 параметры кросс-реактивности для всех исследованных ганглиозидов не превышали 5%. Эти результаты подтверждают литературные данные о строгой специфичности к GD2 антител 14G2a и, главное, характеризуют антитела 9P-L1, из полученной нами гибридомы, как строго специфичные антитела к ганглиозиду GD2.

Для подтверждения результатов, полученных иммуноферментным анализом, об отсутствии кросс-реактивности антител 9P-L1 с другими ганглиозидами было проведено цитометрическое окрашивание клеток различными GD2-специфичными антителами. Исходя из анализа ганглиозидного состава клеточных линий методом TCX [183], а также результатов окрашивания клеток анти-GD2-мАт 14G2a и анти-GD3-мАт R24 были отобраны GD2+GD3-, GD2+GD3+, GD2-GD3+- и GD2-GD3--клеточные линии. Результаты поверхностного окрашивания этих линий представлены в Таблице 6.

Таблица 6. 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 6 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, в данном случае, 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-мАт R24 покрасили клетки линий mS и SKOV-3. Все использованные в эксперименте антитела не связывались с поверхностью GD2- и GD3-негативных клеток линии Jurkat.

Даже не смотря на то, что полученная гибридома, продуцирует антитела класса IgM, а молекулы данного класса антител не являются оптимальными для исследований по ряду причин и прежде всего в силу своего гигантского размера и большой молекулярной массы (700-1100 кДа), антитела 9P-L1 обладают хорошими характеристиками связывания и

специфичностью, что делает их удобной исходной молекулой для получения фрагментов антител и различных рекомбинантных производных.

На следующем этапе работы было интересно получить и проверить цитотоксические эффекты фрагментов полученных моноклональных антител 9P-L1.

4.1.6 Энзиматическое получение фрагментов GD2-специфичных моноклональных антител класса IgM

На данном этапе работы стояла задача энзиматического получения фрагментов GD2-специфичных антител 9P-L1 для изучения их способности индуцировать гибель GD2-позивных опухолевых клеток.

Разные типы IgM по-разному подвергаются энзиматическому расщеплению в ходе данного процесса. Например, мышинные и человеческие IgM имеют довольно существенные структурные различия в способе укладки мономеров в пентамеры, что обусловлено различным положением дисульфидных связей. Помимо этого, они отличаются по составу олигосахаридных участков, что также может сильно влиять на процесс расщепления. Фрагментация IgM при помощи протеолитических ферментов отличается от фрагментации антител класса IgG, что также связано с особенностями структуры этих молекул. Тяжелые μ -цепи IgM собраны в несколько глобулярных доменов, а вместо пролин-богатого шарнирного участка в молекуле IgM присутствует обогащенный углеводами $C\mu 2$ домен, что в конечном итоге приводит к гетерогенному расщеплению молекулы при помощи папаина, одного из наиболее распространенных ферментов, применяемых для данных целей. Поэтому, при расщеплении IgM в основном используются ферменты трипсин и пепсин с индивидуальным подбором условий.

Фрагменты антител 9P-L1 были получены протеолизом при помощи гидролазы пепсина, иммобилизованного на шариках агарозы. Данный фермент специфически разрушает молекулу IgM между $C\mu 1$ -, $C\mu 2$ - и $C\mu 3$ -доменами (см. Материалы и методы). 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). Исходя из литературных данных, нами были выбраны оптимальные условия гидролиза (включая время и температуру) для получения Fab- и F(ab)'2-фрагментов мышинных антител класса IgM.

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. Чистота данной фракции определялась предыдущими стадиями очистки антител 9P-L1. К сожалению, хроматографическое разделение полученной смеси на индивидуальные типы фрагментов оказалось нетривиальной задачей, в связи с чем, для последующих экспериментов нами была использована общая фракция GD2-связывающих фрагментов, содержащих F(ab)'2 и Fab-фрагменты антител 9P-L1.

Было проведено поверхностное окрашивание клеток мышинной лимфомы линии EL-4 с использованием полученных GD2-специфичных фрагментов антител. Гистограммы, представленные на Рисунке 34, демонстрируют увеличение уровня средней интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных полученными GD2-специфичными фрагментами антител

9P-L1 по сравнению с контрольными клетками. После инкубации с фрагментами антител в сравнительно высокой концентрации (10 мкг/мл), обнаружен значимый сдвиг интенсивности флуоресценции относительно контрольных клеток (Рисунок 33).

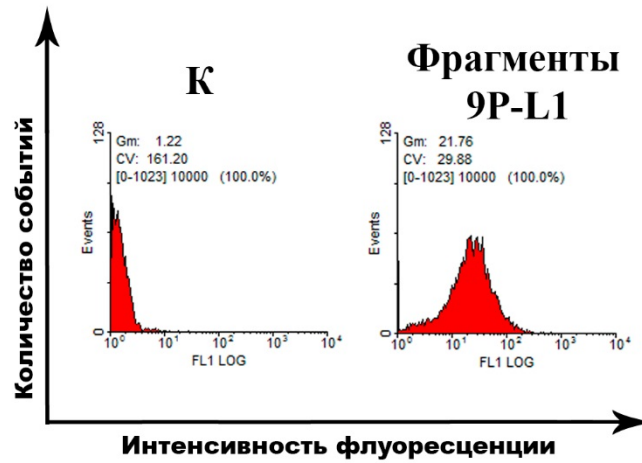


Рисунок 33. Цитометрические измерения клеток мышинной лимфомы EL-4, окрашенных GD2-специфичными фрагментами антител 9P-L1 (10 мкг/мл), вторые антитела anti-mouse fab-specific-FITC (Titr 1:2000). Представлены результаты репрезентативного эксперимента. Было проведено не менее 3 экспериментов.

Для изучения цитотоксических эффектов полученных фрагментов антител было произведено измерение уровня фрагментации ДНК в опухолевых клетках мышинной лимфомы линии EL-4 после суточной инкубации с GD2-специфичными фрагментами моноклональных антител. Как видно из представленных графиков, полученные фрагменты способны достоверно индуцировать гибель опухолевых клеток, количество клеток с фрагментированной ДНК увеличилось практически в два раза по сравнению с контрольными клетками (Рисунок 34), при этом следует отметить, что по сравнению с полноразмерными антителами 9P-L1 эффекты снизились незначительно. Этот результат показывает, что фрагменты GD2-специфичных антител 9P-L1 сохраняют свойства полноразмерных иммуноглобулинов индуцировать гибель опухолевых GD2-позитивных клеток.

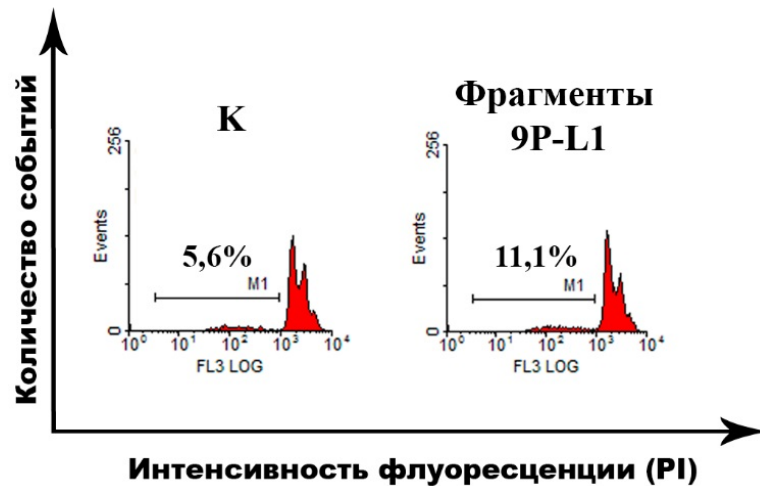


Рисунок 34. PI-тест. Цитотоксические эффекты фрагментов GD2-специфичных антител 9P-L1. Анализ уровня фрагментации ДНК клеток GD2-позитивной клеточной линии EL-4 после инкубации (24 ч) с GD2-связывающими фрагментами антител (500 тыс. клеток /образец, 10 мкг/мл). Маркером обозначена доля клеток с фрагментированной ДНК. Представлены результаты репрезентативного эксперимента. Было проведено не менее 3 экспериментов.

Энзиматическое получение GD2-связывающих фрагментов (Fab- и F(ab)[']2) антител 9P-L1 и изучение их цитотоксической активности позволило решить одну из основных задач исследования – 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. Как было написано выше, в нашем распоряжении имеется гибридома НВ9326, продуцирующая GD2-специфичные антитела ME361. Эти антитела имеют кросс-реактивность с ганглиозидом GD3, но поскольку в работе использованы клеточные линии не экспрессирующие GD3, то данные антитела являются подходящим инструментом для изучения гибели опухолевых клеток при воздействии антител и/или их фрагментов на опухолеассоциированный ганглиозид GD2. Следует отметить, что антитела ME361, относятся к классу IgG, для которых методики получения и очистки индивидуальных фрагментов являются однозначными и относительно простыми.

4.1.7 Энзиматическое получение Fab-фрагментов GD2-специфичных антител ME361

Для энзиматического получения Fab-фрагментов антител класса IgG использовали GD2-специфичные антитела ME361. Как было описано ранее, антитела ME361 выделяли из кондиционной среды гибридомы, а также из асцитной жидкости с использованием колонки с Protein A и дополнительной очисткой на катионной колонке TSKgel SP-5PW. Fab-фрагменты антител ME361 были получены методом протеолиза с использованием фермента папаина. Папаин разрушает молекулу иммуноглобулина класса IgG в шарнирной области выше дисульфидных связей, в результате чего образуются два основных фрагмента с молекулярными массами 45 и 50 кДа. Один из этих фрагментов (Fab; 50 кДа) сохраняет способность связывать антиген. Другой C-концевой фрагмент (Fc; 45 кДа) опосредует эффекторные функции антител. Схема получения Fab-фрагментов ME361 представлена на Рисунке 35.

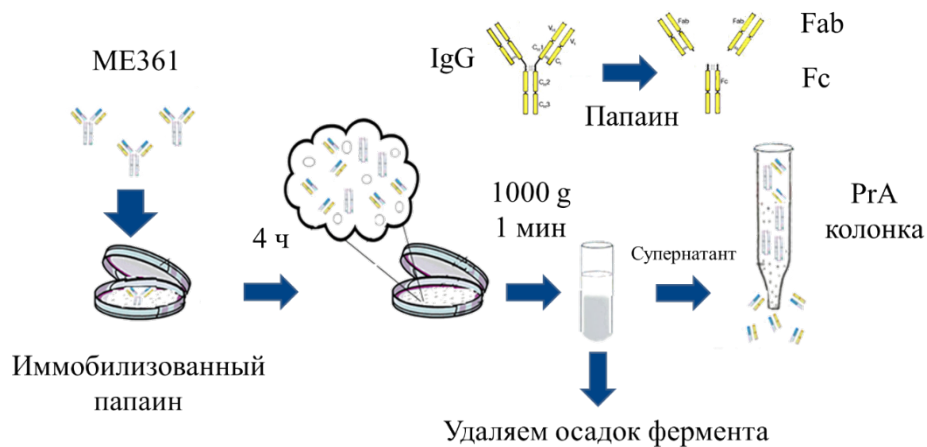


Рисунок 35. Схема получения Fab-фрагментов антител ME361.

Чистоту полученных фракций Fab-фрагментов антител ME361 оценивали с помощью электрофореза в ПААГ (10%). В качестве контроля использовали исходные антитела ME361. Поскольку электрофорез проходил в денатурирующих условиях, в образце полноразмерных антител видны 2 полосы, соответствующие тяжелым (55 кДа) и легким (25 кДа) цепям иммуноглобулина. В случае образца Fab-фрагментов, присутствует только одна полоса в диапазоне 25-30 кДа, соответствующая легким цепям и остаткам тяжелых цепей, образовавшихся после активности фермента папаина, других полос обнаружено не было, что говорит об отсутствии белковых примесей (Рисунок 36).

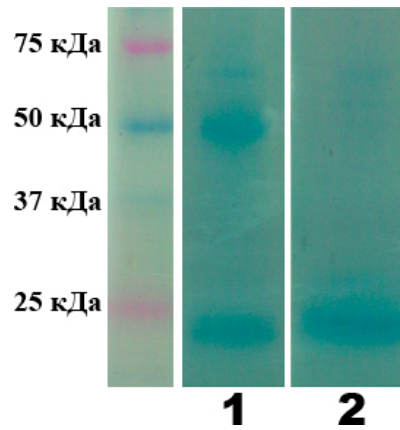


Рисунок 36. ПААГ-электрофорез (10%) GD2-специфичных антител и их фрагментов. 1 - Антитела ME361; 2 - Fab-фрагменты антител ME361.

Специфичность связывания полученных Fab-фрагментов антител ME361 с ганглиозидом GD2 оценивали методами конфокальной микроскопии, проточной цитометрии, ИФА и дот-блот анализом.

Поверхностное окрашивание клеток GD2-положительных линий EL-4 и mS показало связывание полученных Fab-фрагментов антител ME361 с поверхностью клеток (Рисунок 37). Интенсивность флуоресценции меченых Fab-фрагментами клеток оказалась ниже, чем при их окрашивании полноразмерными антителами. Так, для клеток линии мышинной лимфомы EL-4 отношение MFI ME361 к MFI Fab ME361 составляло 2.13, а для клеток линии меланомы человека mS оно равнялось 2. Вероятно, сниженная интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных Fab-фрагментами антител ME361, объясняется моновалентным взаимодействием Fab-фрагментов с антигеном – ганглиозидом GD2. Окрашивание клеток GD2-негативных опухолевых линий человеческой лимфомы Jurkat и человеческой меланомы A375 Fab-фрагментами антител ME361 не приводило к изменению интенсивности флуоресценции клеток относительно контроля.

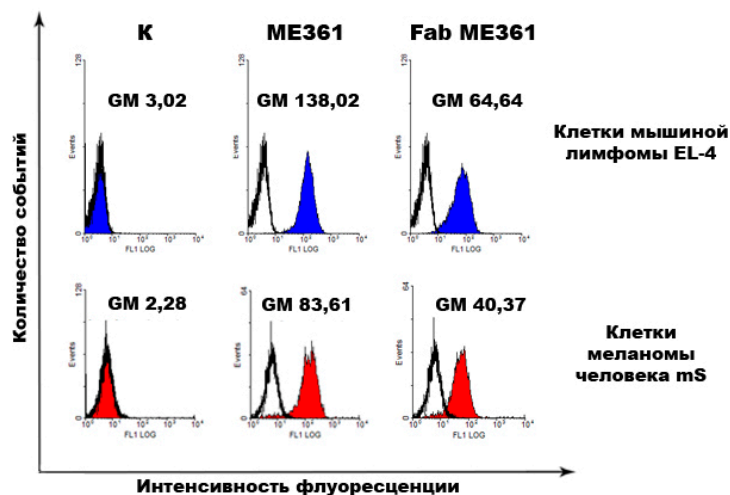


Рисунок 37. Гистограммы окрашивания клеток GD2-положительных опухолевых линий EL-4 и mS антителами ME361 и Fab ME361 в концентрации 50 нМ.

Анализ конфокальных изображений, полученных при окрашивании клеток GD2-позитивных опухолевых линий Fab-фрагментами антител ME361, подтвердил наличие связывания фрагментов с поверхностью выбранных линий (Рисунок 38).

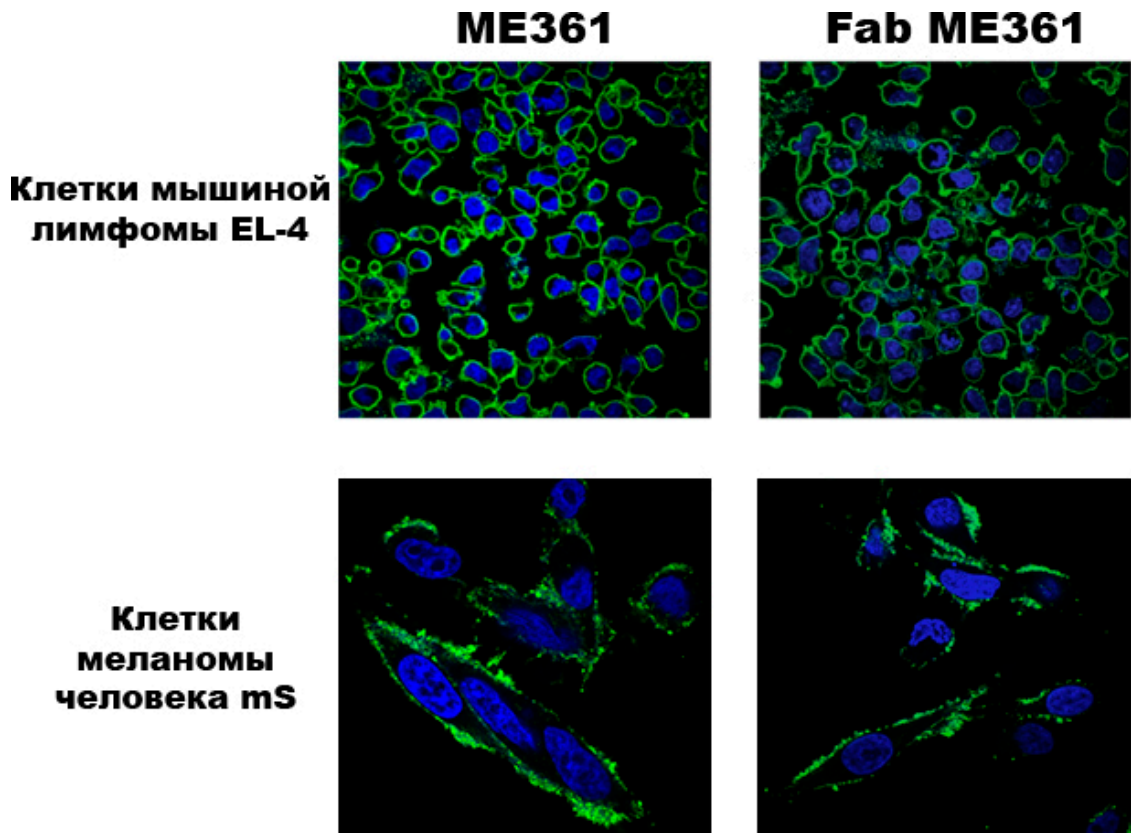


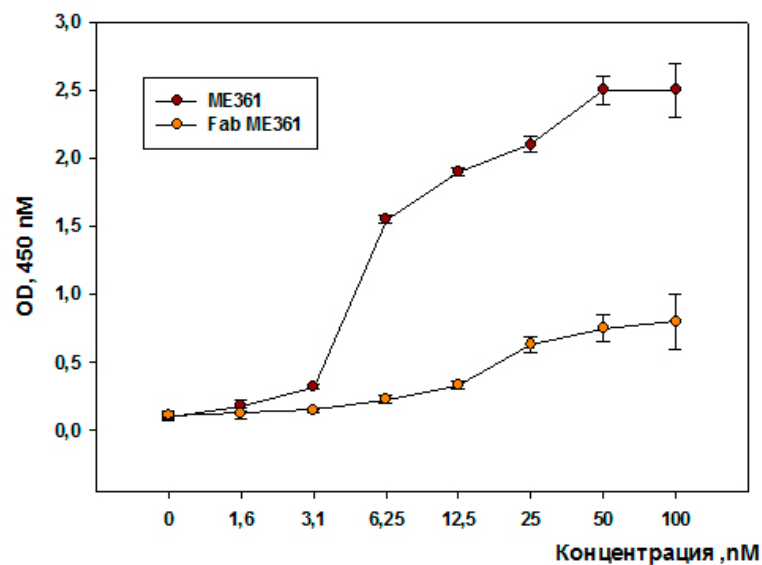
Рисунок 38. Конфокальная микроскопия клеток линий EL-4 и mS. Синим – ядра, окрашенные Hoechst 33342, зеленым – ганглиозид GD2, окрашенный антителами ME361, а также их Fab-фрагментами.

Представлялось важным оценить связывание полученных Fab-фрагментов с чистым антигеном. Для этого связывание ганглиозида GD2 с полноразмерными антителами и их фрагментами оценивали методами ИФА и дот-блот анализом. Как видно из Рисунка 39 А титровка антител ME361 и их фрагментов при постоянной концентрации сорбированного ганглиозида GD2 (0.25 мкг/лунка) привела к значительному увеличению оптической плотности раствора после проявления пероксидазной реакции относительно контрольных точек, в которых вместо антител или фрагментов антител добавлялся PBS. В то же время оптическая плотность раствора в соответствующих молярных концентрациях антител и их Fab-фрагментов значительно различается. Как обсуждалось выше, это может объясняться моновалентным взаимодействием Fab-фрагментов с антигеном, в то время как для антител класса IgG, к которым относятся анти-GD2-мАт ME361, характерно бивалентное взаимодействие с ганглиозидом GD2. Также, более высокие значения OD раствора после связывания антител, объясняется использованием поликлональных антивидовых HRP-меченных антител, которые распознают эпитопы по всей молекуле IgG. В связи с этим даже в случае одинакового

количества антител и Fab-фрагментов, связавшихся с антигеном, количество связанных антивидовых HRP-меченых антител будет существенно различаться, и сигнал с пероксидазной реакции будет значимо выше для полноразмерных антител. В последующей работе для более точного сравнения связывающей способности антител и их Fab-фрагментов будут использоваться антивидовые Fab-специфичные антитела.

Связывание полученных Fab-фрагментов с ганглиозидом GD2 также было проанализировано с использованием дот-блота Рисунок 39 Б. Для этого ганглиозид GD2 в различных концентрациях наносился на нитроцеллюлозную мембрану, после чего проводилось окрашивание антителами ME361 и их Fab-фрагментами в постоянной концентрации. В результате было показано связывание Fab-фрагментов с ганглиозидом GD2. Минимальное количество ганглиозида, детектируемое этим методом в случае использования Fab-фрагментов составило 80 нг, тогда как при использовании полноразмерных антител ME361 удалось детектировать 20 нг антигена, нанесенного на нитроцеллюлозную мембрану.

А)



Б)

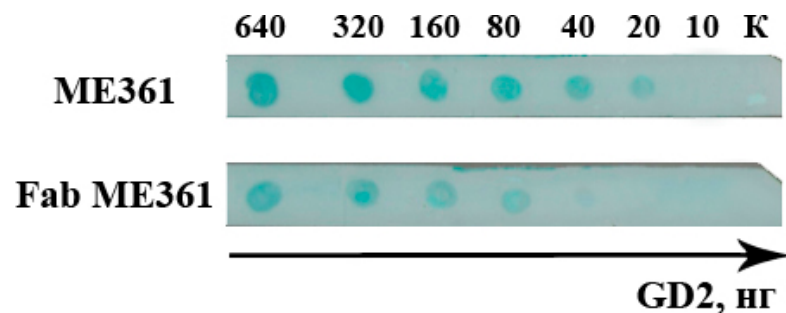


Рисунок 39. А – ИФА. Нанесены различные концентрации антител и их Fab-фрагментов. Антивидовые HRP-меченые Fab-специфичные антитела (1:6000). На подложке ганглиозид GD2 (250 нг/лунка). Каждая точка в трёх повторах.

Б – Дот-блот анализ GD2-специфичных антител и их фрагментов. На нитроцеллюлозную мембрану нанесены различные количества ганглиозида GD2 (10-640 нг). Окрашивание проводили 50 нМ раствором антител ME361 или их Fab-фрагментами. Антивидовые HRP-меченые Fab-специфичные антитела (1:6000).

Представленные данные говорят о том, что нами были получены чистые фракции Fab-фрагментов анти-GD2-мАт ME361, которые сохранили специфичность связывания с ганглиозидом GD2.

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

Сравнительная оценка цитотоксических эффектов, индуцируемых полученными Fab-фрагментами анти-GD2-мАт ME361 и полноразмерными антителами, проводилась с использованием нескольких классических подходов. В качестве клеточной модели исследования была использована линия мышины лимфомы EL-4, которая характеризуется гиперэкспрессией ганглиозида GD2. Количество этого ганглиозида в клетках EL-4 составляет ~ 300 пмоль/ 10^6 клеток [183]. На первом этапе была проанализирована выживаемость клеток EL-4 в присутствии различных концентраций Fab-фрагментов и полноразмерных антител ME361. Клетки лимфомы EL-4 инкубировались с последовательными разведениями антител и их Fab-фрагментов в эквимоллярных концентрациях в течение 72 ч, после чего оценивался уровень жизнеспособности клеток в МТТ-тесте (Рисунок 40).

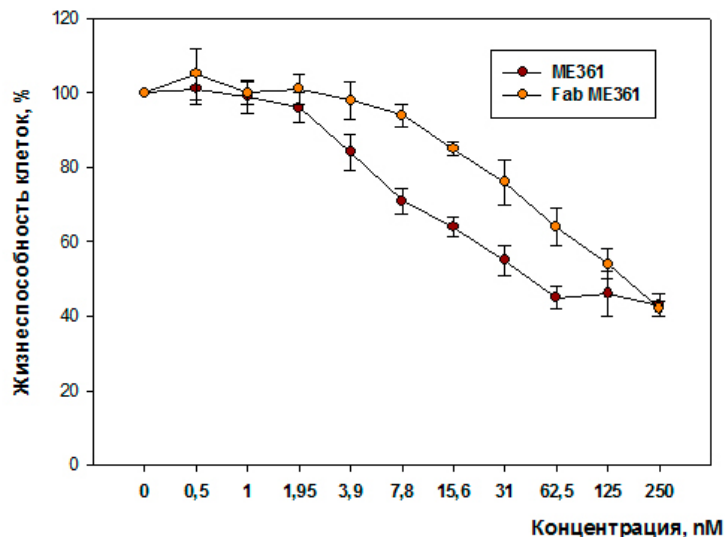


Рисунок 40. МТТ-тест клеток EL-4. Клетки (10 тыс/лунка) инкубировались 3 дня в 96 луночном планшете с последовательными разведениями ME361 и их Fab-фрагментов. По оси X - концентрация антител ME361 и их Fab-фрагментов, по оси Y – жизнеспособность клеток в % от контроля. Каждая точка в трех повторах. Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов.

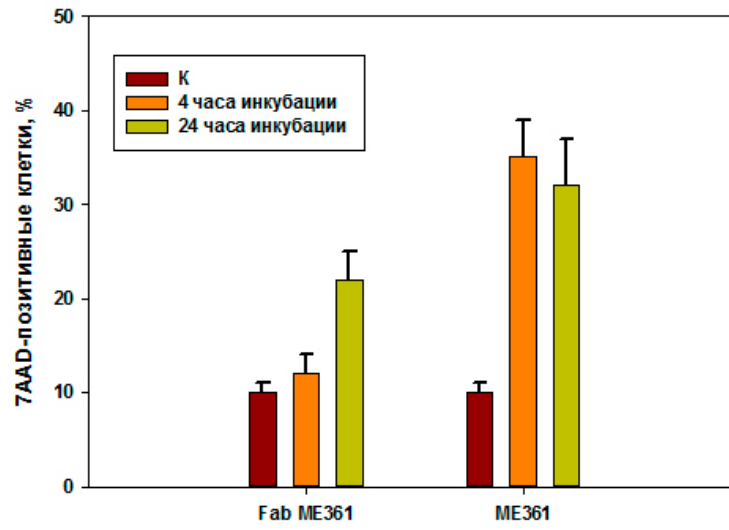
Как видно из Рисунка 40, Fab-фрагменты и полноразмерные антитела ME361 значительно снижают жизнеспособность клеток GD2-позитивной линии EL-4. Форма кривых снижения жизнеспособности клеток, индуцированного антителами и фрагментами различается. Так для антител ME361 характерно более выраженное снижение выживаемости клеток на низких концентрациях с последующим выходом на плато, в то время как Fab-фрагменты антител индуцировали более плавное ингибирование клеток, при этом выхода на плато не наблюдалось даже при высоких концентрациях. Возможно, более выраженные цитотоксические эффекты

полноразмерных антител на низких концентрациях связаны с их бивалентным взаимодействием с ганглиозидом GD2, что может приводить к кластеризации антигена и перестройкам на плазматической мембране. Fab-фрагменты антител, имея несколько сниженную активность на низких концентрациях, на высоких концентрациях достигают эффектов сравнимых с антителами. Также представляется важным, что анти-GD2-мАт ME361, начиная с концентрации около 60 нМ и выше, проявляют одинаковую цитотоксическую активность, то есть с определенного момента увеличение концентрации антител не приводит к уменьшению жизнеспособности клеток. Возможно, этот факт связан с большим размером антител и стерическими препятствиями взаимодействия анти-GD2-мАт ME361 с ганглиозидом при их высоких концентрациях. Для Fab-фрагментов выхода на плато не наблюдается и происходит равномерное дозозависимое снижение жизнеспособности клеток EL-4.

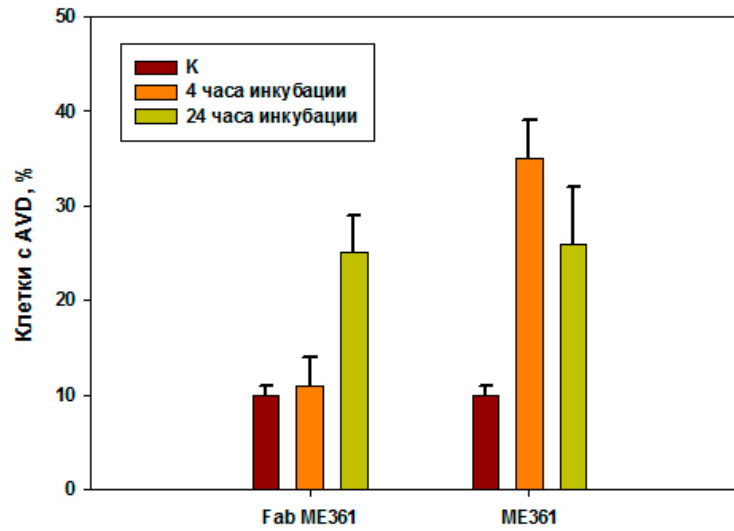
В следующей серии экспериментов, направленных на изучение цитотоксических эффектов Fab-фрагментов и целых антител ME361, были использованы методы проточной цитофлуориметрии. Влияние фрагментов и полноразмерных антител на клетки мышинной лимфомы EL-4 оценивали по нескольким параметрам: 1) нарушение целостности плазматической мембраны с использованием флуоресцентного зонда 7-AAD; 2) изменение клеточного объема, определяемого в координатах прямого и бокового светорассеяния; 3) определение уровня клеток с фрагментированной ДНК в PI-тесте (Рисунок 41). Изучение этих характеристик клеток проводилось в двух временных точках через 4 часа и 24 часа после инкубации с антителами и их фрагментами.

Чтобы определить, влияет ли инкубация клеток EL-4 с антителами ME361 и их Fab-фрагментами на целостность плазматической мембраны, был использован флуоресцентный ДНК-интеркалятор 7-амино-актиномицин D (7-AAD), который способен проникать в клетки с нарушенной целостностью мембраны через ее разрывы или поры, в то время как клетки с неповрежденной мембраной не окрашиваются этим красителем. Как видно из Рисунка 41 А, через 4 ч инкубации клеток линии EL-4 с антителами ME361 количество 7-AAD-позитивных клеток существенно повышалось по сравнению с контрольными клетками, которые не подвергались воздействию антител. В то же время после индукции клеток Fab-фрагментами изменений в количестве 7-AAD-позитивных клеток 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 (Рисунок 41 А). Эти данные демонстрируют увеличение проницаемости мембран клеток при действии антител и их Fab-фрагментов. Причем полноразмерные антитела индуцируют нарушение целостности плазматической мембраны на ранних временах инкубации с клетками, в то время как для фрагментов этот процесс оказывается отсроченным.

А)



Б)



В)

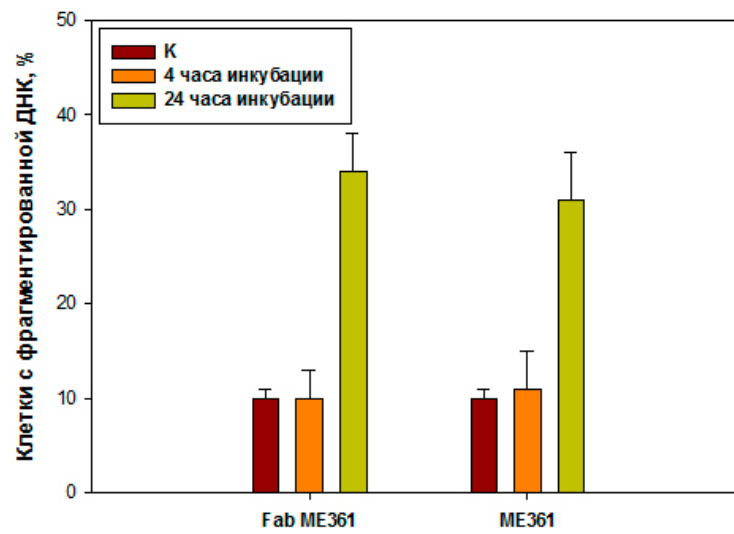


Рисунок 41. А — результаты 7AAD-окрашивания клеток EL-4, проинкубированных с моноклональными антителами ME361 и их Fab-фрагментами (50 нМ). Б — результаты цитометрического измерения AVD клеток EL-4, обработанных моноклональными антителами ME361 и их Fab-фрагментами (50 нМ). В — результаты PI-теста клеток EL-4, проинкубированных с моноклональными антителами ME361 и их Fab-фрагментами (50 нМ). Каждая точка в трех повторах. Представлены результаты трех независимых экспериментов.

При апоптоз-индуцированном уменьшении объема клеток происходит их сморщивание, которое характеризуется уменьшением размера клеток и увеличением их гранулированности [195]. Поэтому удобным методом детектирования уменьшения клеточного объема (AVD) клеток является его цитометрическое определение в координатах прямого (FS) и бокового (SS) светорассеяния. Как видно из Рисунка 41. Б, при воздействии анти-GD2-мАт ME361 на клетки мышинной лимфомы EL-4 происходит увеличение количества клеток с AVD уже через 4 ч инкубации. Более того, этот показатель возрастал через 24 ч инкубации антител с клетками. С другой стороны, 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 (Рисунок 41 Б).

PI-тест показал, что инкубация в течение 4 ч клеток EL-4 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 (Рисунок 41 В).

Поскольку в случае индукции клеток GD2-специфичными антителами и их фрагментами были зафиксированы различия в прохождении клеточной гибели, представлялось важным провести анализ, направленный на оценку ключевых событий и механизмов клеточной гибели, индуцированной анти-GD2-мАт и их фрагментами.

В настоящее время известно много типов клеточной гибели, наиболее охарактеризованы и изучены апоптоз, некроз и аутофагия. В настоящее время открыто много “неклассических” механизмов гибели клеток [196]. Для отнесения гибели клеток к тому или иному механизму разработаны критерии, которые включают оценку морфологических и биохимических признаков, анализ сигнальных путей и маркерных молекул [197]. Таким образом, изучение молекулярных механизмов клеточной гибели, индуцированной анти-GD2-мАт и их фрагментами, а также сигнальных путей, вовлеченных в этот процесс, является отдельным серьезным исследованием. В данной работе стояла задача определить подходы к оценке и сравнению типа клеточной гибели, а также оценить участие каспаз, ключевых молекул “классического” апоптотического пути, и вовлеченность в этот процесс митохондрий, важнейшей органеллы в проведении многих типов гибели клеток.

Одним из методических подходов, позволяющих дифференцировать гибель клеток на ранний апоптоз и некроз, является FITC-Annexin-V тест. На ранних стадиях апоптоза происходит переход фосфатидилсерина, который в живых клетках локализован на внутреннем монослое плазматической мембраны, на наружный монослой. Появление на поверхности клеток фосфатидилсерина позволяет определить белок Annexin-V, имеющий сродство к данному фосфолипиду. ДНК-интеркалятор PI в тесте используется для разделения живых и апоптотических клеток от некротических. Это возможно благодаря тому, что флуоресцентный краситель PI непроницаем для мембран живых клеток и клеток на ранних стадиях апоптоза, и только нарушение целостности мембраны, характерное для некроза и позднего апоптоза, позволяют красителю проходить в клетки и окрашивать их.

На Рисунке 42 представлено 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 Fab-фрагментами клеток линии EL-4. Короткая инкубация антител и их Fab-фрагментов 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.

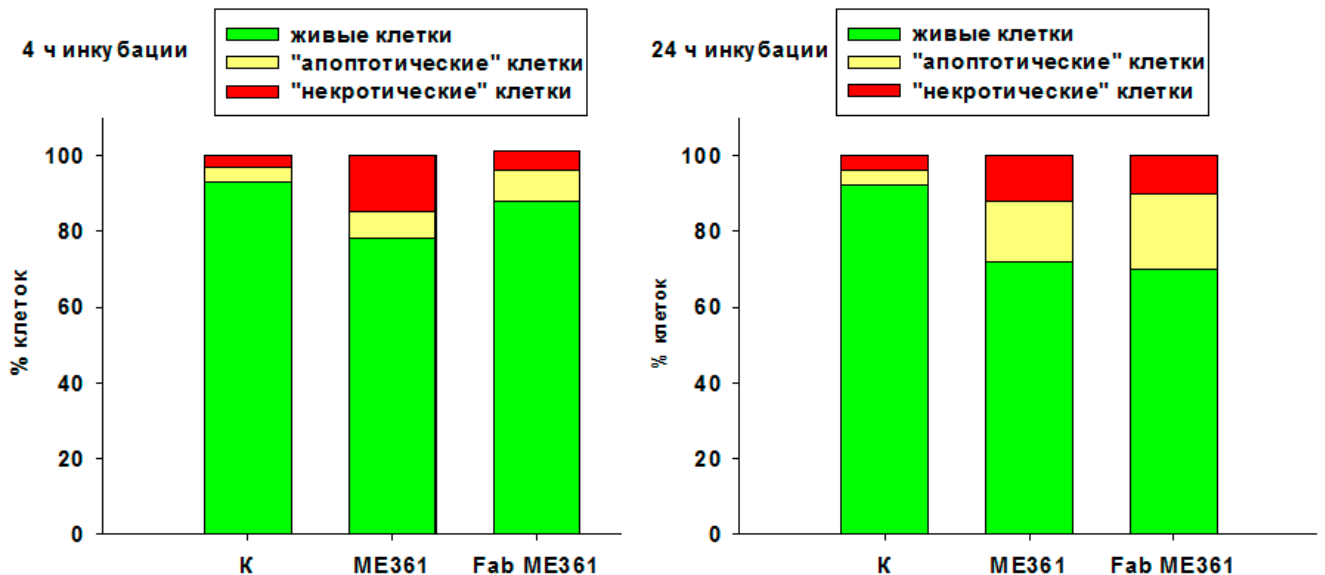


Рисунок 42. FITC-Аннексин V тест. Распределение живых, апоптотических и некротических клеток в популяциях контрольных и индуцированных в течение 4-х (А) и 24-х часов (Б) анти-GD2-мАт ME361 (50 нМ) и их фрагментами (50 нМ) клеток линии EL-4.

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.

Ключевыми ферментами клеточной гибели по пути апоптоза являются каспазы. Чтобы оценить вклад этих ферментов в клеточную гибель, индуцированную анти-GD2-мАт ME361 и их Fab-фрагментами, был использован общий ингибитор каспаз Z-VAD-FMK. Для оценки влияния ингибитора на процессы запускаемые Fab-фрагментами и полноразмерными антителами ME361, был применен PI-тест.

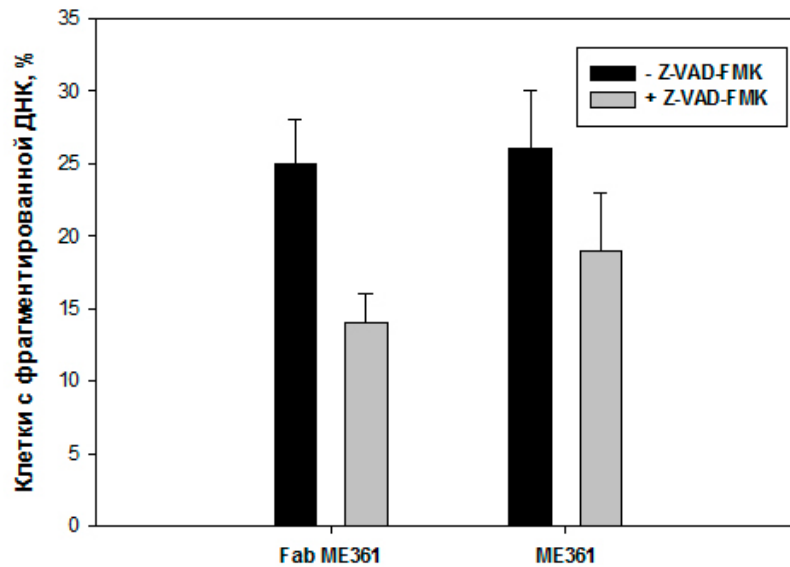


Рисунок 43. PI-тест. 24 ч инкубации клеток линии EL-4 с анти-GD2-мАт ME361 и их Fab-фрагментами (50 нМ) без и с добавлением общего ингибитора каспаз Z-VAD-FMK (15 мкМ). Представлены средние значения трех независимых экспериментов.

Из представленных на Рисунке 43 данных видно, что 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. Однако данное предположение требует дополнительного изучения и подтверждения другими методами и подходами.

Известно, что во многих типах клеточной гибели важную роль играют митохондрии. Для оценки функциональной активности митохондрий в опухолевых клетках EL-4 после инкубации с GD2-специфичными антителами и их Fab-фрагментами был использован флуоресцентный краситель DiOC₆(3). Этот потенциал-чувствительный зонд показал практически полную деполяризацию митохондрий на поздних стадиях клеточной гибели индуцированной как

антителами, так и их фрагментами (данные не представлены). Примечательным является то, что на ранних стадиях прохождения сигнала клеточной гибели, в субпопуляции клеток, сохранивших целостность плазматической мембраны (7-AAD- клетки) и не имеющих изменений в клеточном объеме (AVD- клетки), характерна гиперполяризация митохондриального потенциала после воздействия Fab-фрагментов и полноразмерных антител (Рисунок 44).

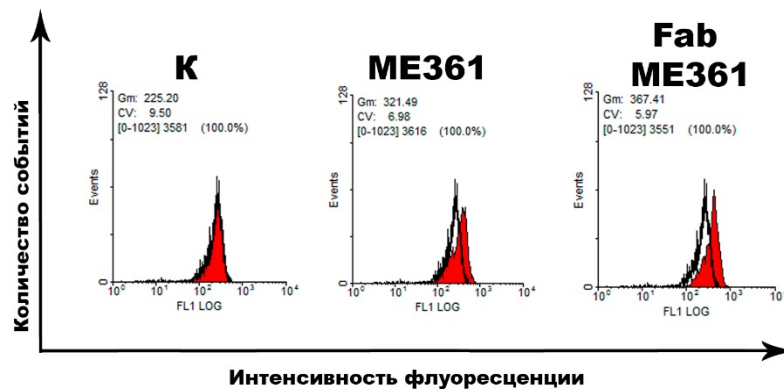


Рисунок 44. Гистограммы окрашивание клеток EL-4 после 4-х часовой инкубации с Fab-фрагментами ME361 (50 нМ) и антителами ME361 (50 нМ) флуоресцентным зондом DiOC6(3). Гейтирование по 7-AAD- и AVD- клеткам.

Как видно из Рисунка 44 гиперполяризация митохондрий выражена в большей степени для клеток, подвергшихся воздействию Fab-фрагментов ME361. Об этом говорит отношение интенсивности флуоресценции DiOC6(3) в подвергшихся воздействию и интактных клетках. Так, интенсивность флуоресценции клеток, инкубированных с анти-GD2-мАт, увеличивается в 1,4 раза, в то время как обработка их Fab-фрагментами приводит к увеличению флуоресценции DiOC6(3) в 1,6 раза. По-видимому, индукция увеличения потенциала митохондрий является первым событием в клетках, происходящим после добавления к ним анти-GD2-мАт ME361 и их Fab-фрагментов.

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. Однако фрагментация ДНК в обоих случаях происходит с некоторой задержкой.

4.1.9 Пегилирование Fab-фрагментов ME361

Одной из основных задач работы являлась оценка противоопухолевых эффектов фрагментов GD2-специфичных антител в мышинной модели рака. Из литературных данных 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 последние годы для улучшения фармакокинетических характеристик Fab-фрагментов моноклональных антител было разработано много различных методик. В качестве наиболее оптимальной модификации фрагментов антител было выбрано монопегилирование Fab-фрагментов. Это связано с тем, что пегилирование белков приводит к существенному увеличению времени циркуляции в организме и эта химическая модификация разрешена в клинической практике. Ковалентная сайт-направленная пришивка PEG-малеимида к цистеину, расположенному в шарнирной области Fab-фрагмента на достаточном удалении от связывающего региона в мягких восстанавливающих условиях, позволяет при сохранении антигенсвязывающих свойств значительно улучшить фармакокинетические характеристики фрагментов.

В отличие от случайного пегилирования, когда пришивка PEG к N-концу Fab-фрагмента, входящего в связывающий регион, может привести к потере аффинности, выбранные в работе условия обеспечивают взаимодействие с цистеинами шарнирной области, что не должно привести к снижению аффинности Fab-фрагментов. Для проведения реакции пегилирования были выбраны два варианта PEG-малеимида, молекулярной массой 5 кДа и 10 кДа.

На первом этапе работы после проведения реакции монопегилирования требовалось провести очистку и оценить чистоту полученных фракций. Для очистки от несвязавшегося полиэтиленгликоля, непрореагировавших Fab-фрагментов и получения чистой фракции монопегилированных Fab-фрагментов была проведена хроматографическая очистка (Рисунок 45) на колонке TSK-GEL SP-5PW (см. Материалы и методы). Выход реакции составлял около 40%.

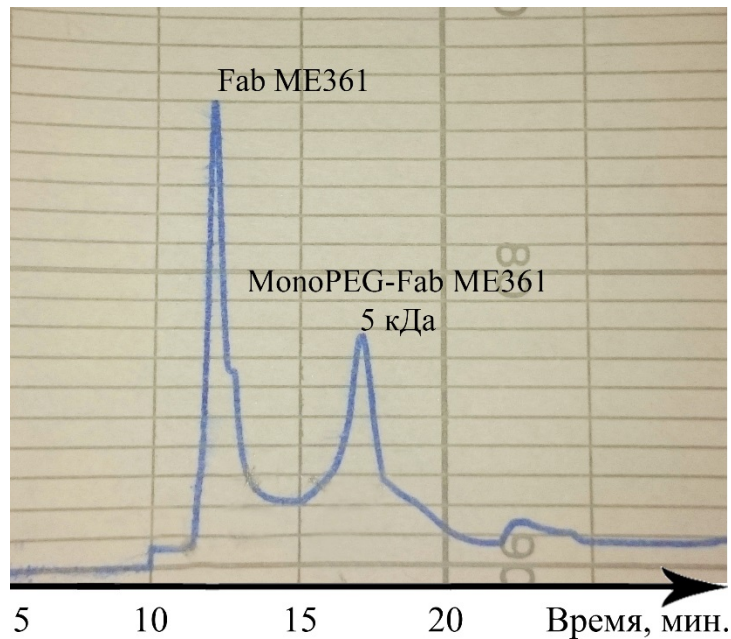


Рисунок 45. Аналитическая ионообменная хроматография монопегилированных Fab-фрагментов антител ME361.

Характеристика и проверка чистоты полученных фракций осуществлялась при помощи электрофореза, который проводился в восстанавливающих/невосстанавливающих условиях (Рисунок 46). На электрофорезе, проведенном в восстанавливающих условиях (Рисунок 46 А) видны полосы, соответствующие тяжелым и легким (25 кДа) цепям Fab-фрагмента, посторонних полос не обнаружено. При этом, как можно видеть, для образцов с пришитым полиэтиленгликолем, молекулярная масса увеличилась на 5-10 кДа, что позволяет предположить успешное проведение реакции пегилирования Fab-фрагментов моноклональных антител ME361. В случае электрофореза в невосстанавливающих условиях отчетливо видны полосы, соответствующие полноразмерным Fab-фрагментам (Рисунок 46 Б), монопегилированным Fab-фрагментам 5 кДа (~55 кДа) и 10 кДа (~60 кДа) (Рисунок 46 Б).

На следующем этапе работы для оценки сохранения специфичности и цитотоксической активности полученных пегилированных Fab-фрагментов были использованы методы проточной цитометрии и иммуноферментного анализа.

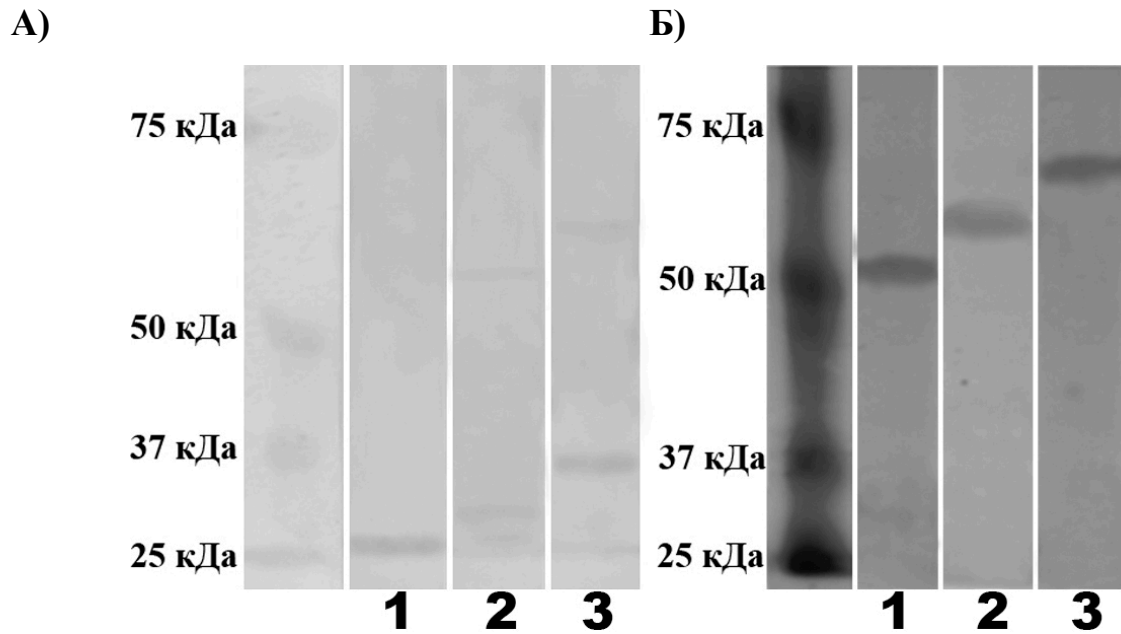


Рисунок 46. Электрофорез в ПААГ (12,5%) Fab-фрагментов антител ME361 в восстанавливающих условиях (А) и невосстанавливающих условиях (Б). 1). Фракция Fab-фрагментов антител ME361 2). Фракция монопегелированных Fab-фрагментов антител ME361 5 кДа. 3). Фракция монопегелированных Fab-фрагментов антител ME361 10 кДа.

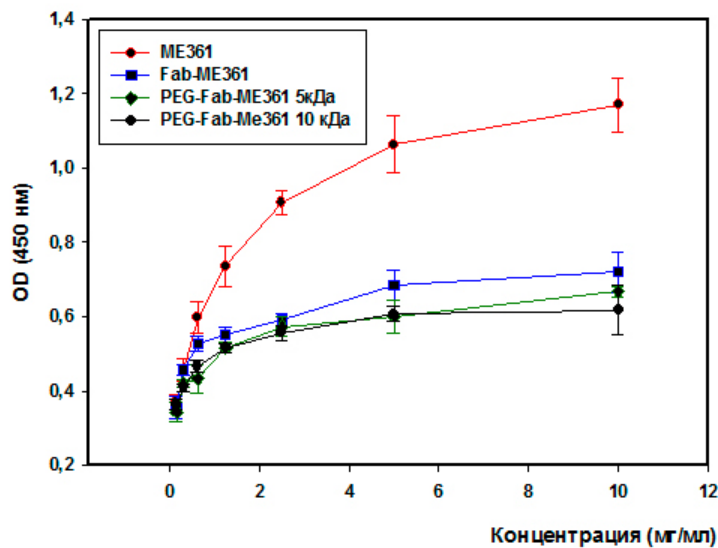


Рисунок 47. Прямой ИФА, вторичные антитела anti-mouse-HRP fab-specific 1:2000. На подложке ганглиозид GD2 (5 мкг/мл, 250 нг/лунка). Каждая точка в трёх повторах.

Как видно из Рисунка 47, Fab-фрагменты GD2-специфических моноклональных антител сохранили способность связывать ганглиозид GD2 после конъюгации с полиэтилен гликолем как в случае 5 кДа, так и 10 кДа. При этом не наблюдается сильной потери аффинности по сравнению с неконъюгированными Fab-фрагментами, снижение на 10-15% можно объяснить за счет частичного неправильного пегелирования. Однако доступность эпитопов ганглиозида GD2 адсорбированного на пластике может отличаться от мембранного опухолеассоциированного

ганглиозида GD2. Таким образом, на следующем этапе нашей работы требовалось оценить связывающую способность пегилированных Fab-фрагментов в системе *in vitro*.

Как видно из Рисунка 48, как контрольные GD2-специфические антитела ME361, так и полученные фрагменты антител, а также пегилированные Fab-фрагменты 5 и 10 кДа, показали связывание с клетками, однако эффективность связывания различается. Средняя интенсивность флуоресценции в образцах окрашенных антителами ME361 в 45 раз выше, чем в контрольном образце. Окрашивание клеток Fab-фрагментами антител ME361 и пегилированными Fab-фрагментами, также привело к усилению интенсивности флуоресценции по сравнению с контролем (соответственно в 21, 16 и 14 раза выше, чем в контрольных клетках). В данном эксперименте контролем выступают клетки, прошедшие те же процедуры, что и экспериментальные образцы, за исключением стадии окрашивания антителами к GD2 или их фрагментами, вместо этого к суспензии клеток был добавлен буфер. Падение уровня средней интенсивности флуоресценции можно объяснить неправильной сшивкой молекул ПЭГ в ходе реакции, т.к. очистка от таких фрагментов в нашем случае практически не возможна.

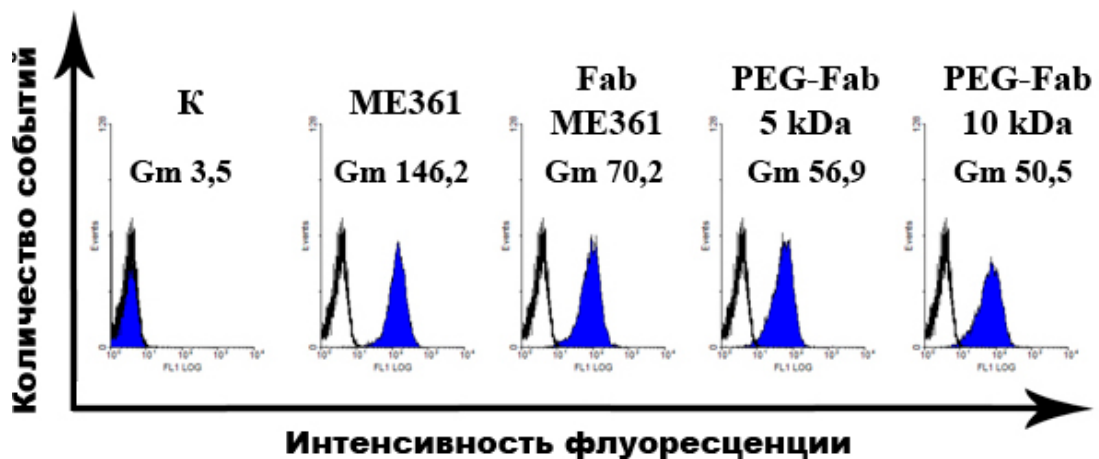


Рисунок 48. Цитометрические измерения клеток EL-4, окрашенных GD2-специфичными антителами ME361 а также их фрагментами. Пики, обозначенные цветом, отражают флуоресценцию клеток, окрашенных GD2-мAb, контур – пик контрольных клеток, окрашенных анти-изотипическими антителами. Представлены результаты репрезентативного эксперимента. Было проведено не менее 3 экспериментов.

В предыдущем разделе было показано, что Fab-фрагменты антител ME361 сохраняют прямые цитотоксические эффекты полноразмерных GD2-специфичных антител. Поэтому представлялось важным на данном этапе оценить, как пегилирование влияет на способность Fab-фрагментов индуцировать гибель опухолевых клеток.

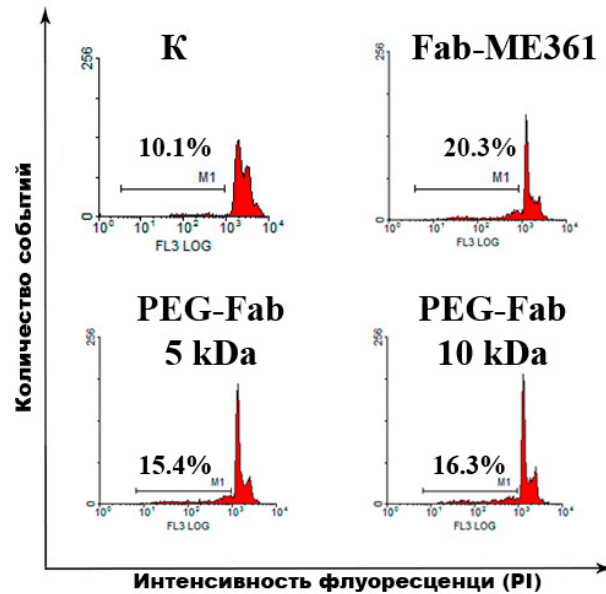


Рисунок 49. Цитотоксические эффекты фрагментов GD2-специфичных антител ME361. PI-тест. Анализ уровня фрагментации ДНК GD2-позитивной клеточной линии EL-4 после суточной инкубации (500 тыс. клеток /образец, 5 мкг/мл). Маркером обозначена доля клеток с фрагментированной ДНК. Представлены результаты репрезентативного эксперимента. Было проведено как минимум 3 эксперимента.

На Рисунке 49 представлены результаты PI-теста клеток EL-4 после 24-х часовой инкубации с Fab-фрагментами антител ME361, а также их пегилированными производными, специфичными к ганглиозиду GD2. Как видно из рисунка, 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, проведенная нами реакция сайт-направленного монопегилирования не отразилась на функциональной активности полученных ранее энзиматическим путем Fab-фрагментов GD2-специфичных антител ME361, что было показано различными методами. Монопегилированные Fab-фрагменты антител ME361 сохраняют способность не модифицированных Fab-фрагментов связывать опухолеассоциированный ганглиозид GD2 и индуцировать гибель GD2-позитивных опухолевых клеток. Так как известно, что пегилирование достоверно увеличивает время циркуляции фрагментов моноклональных антител в организме, проведение данного этапа позволяет ожидать усиления противоопухолевых эффектов модифицированных фрагментов GD2-специфичных моноклональных антител в системе *in vivo*. Помимо этого, проведенная отработка методики и оптимизация условий сайт-направленного пегилирования будут использованы в дальнейшей работе, в частности для модификации рекомбинантных фрагментов.

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

Изучение цитотоксических эффектов фрагментов GD2-специфичных антител в системе *in vitro* является важным этапом в разработке нового типа противоопухолевых препаратов, однако для адекватной оценки противоопухолевых эффектов обязательным условием является проведение экспериментов в мышинной модели перевиваемой опухоли *in vivo*.

На сегодняшний день для исследования онкогенеза зачастую используются мышинные модели. Мышиная модель имеет ряд преимуществ по сравнению с другими моделями млекопитающих, например: малые размеры животных, относительно недорогое содержание, короткий репродуктивный цикл, изученный геном, что значительно упрощает использование методов генной инженерии. В экспериментальной онкологии создано несколько типов мышинных моделей. К ним относятся спонтанные, перевиваемые, индуцированные и генно-инженерные модели. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки. Часто применяются комбинированные модели опухолей, выбор правильной мышинной модели для каждой конкретной задачи имеет особое значение [198].

Для того, чтобы оценить противоопухолевую активность GD2-специфичных антител и их Fab-фрагментов ранее была создана сингенная мышинная модель рака. Для этого мышам линии СВЛ в хвостовую вену вводили клетки Т-лимфомы EL-4. Из литературных данных известно, что при таком способе введения клеток лимфомы EL-4 метастазы в основном образуются в печени [199].

На первом этапе виделось целесообразным сравнить динамику используемых противоопухолевых агентов, с целью оценить привело ли пегилирование фрагментов антител к увеличению времени их циркуляции в крови. Для проверки стабильности был исследован титр Fab-фрагментов и их пегилированных аналогов в сыворотке мышей линии СВЛ на протяжении трех недель. Животным внутривенно вводили Fab-фрагменты или их пегилированные аналоги (200 мкг/мышь), затем на разных временных интервалах проводился забор крови (100 мкл) и методом ИФА определялось присутствие GD2-связывающих фрагментов.

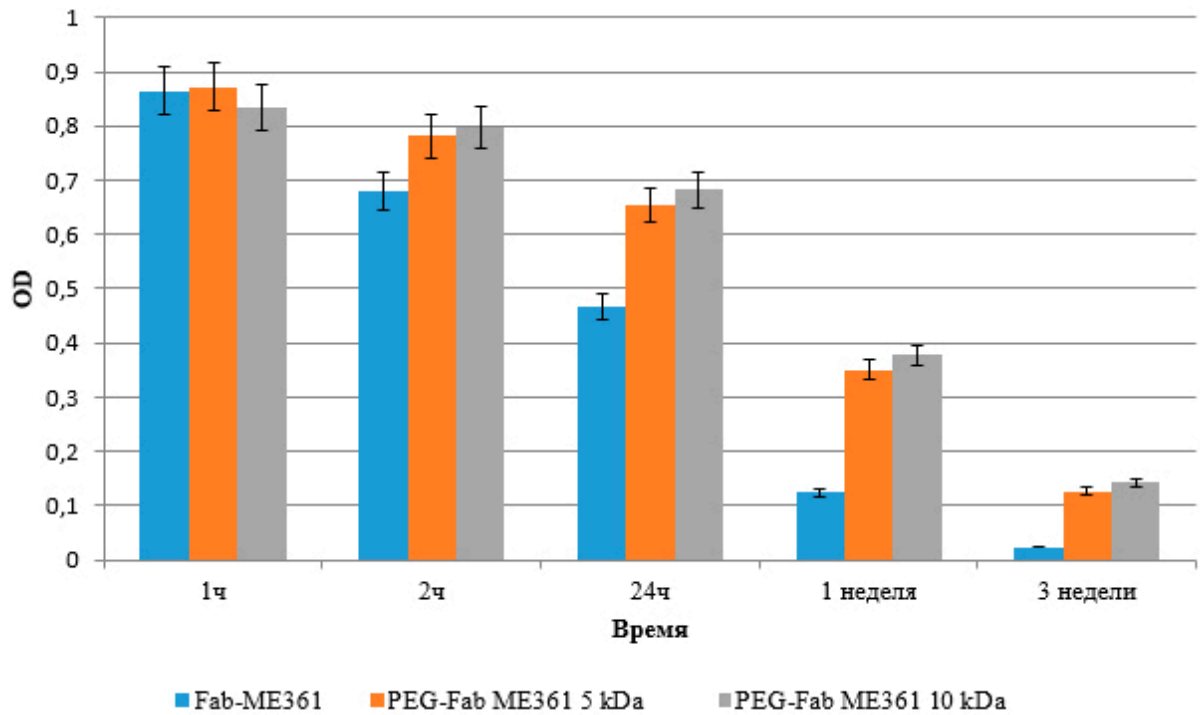


Рисунок 50. Сравнение времени циркуляции Fab-фрагментов и их пегилированных аналогов методом прямого ИФА. Связывание сывороткой крови мышей ганглиозида GD2 (См. Материалы и методы). 250 нг/лунка ганглиозида GD2.

Как видно из Рисунка 50, пегилирование Fab-фрагментов GD2-специфических моноклональных антител ME361 позволило значительно увеличить время их циркуляции в системе *in vivo*.

На следующем этапе работы были исследованы противоопухолевые эффекты Fab-фрагментов ME361 и их пегилированных аналогов на модели перевиваемой опухоли. Для чего лабораторным животным в хвостовую вену были введены клетки Т-лимфомы EL-4. Схема эксперимента представлена в Таблице 7.

Таблица 7. 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. Почти для всех животных этой группы было характерно ожирение. 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 (Рисунок 51).

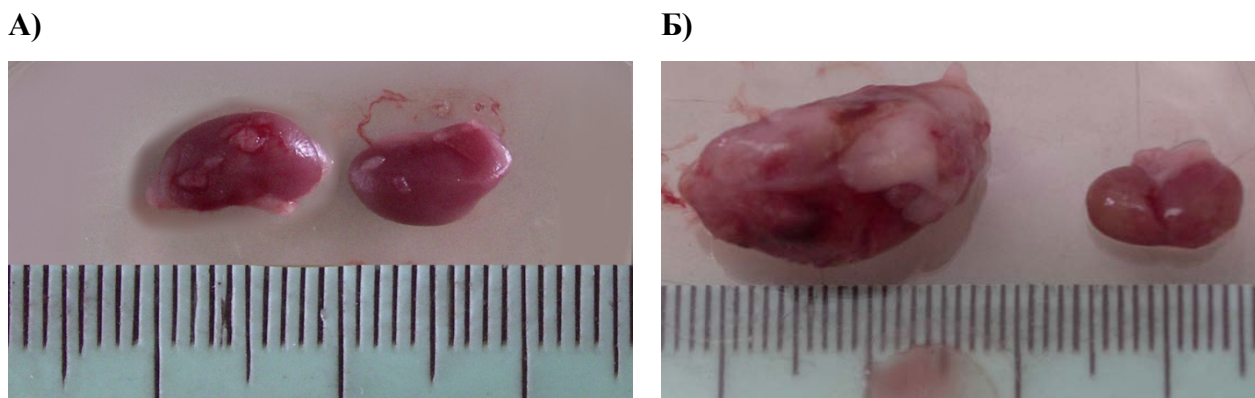


Рисунок 51. Визуальное сравнение почек лабораторных животных контрольной группы 2 (См. Материалы и методы).

Метастазы в почках также обнаруживались в группах 4 (животные, получившие однократную дозу Fab-фрагментов), 5 (терапия монопегилированными Fab-фрагментами) и 6 (животные, получившие двукратную дозу Fab GD2-mAb). 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. Измерение массы почек животных во всех группах показало, что существенно от контрольных значений (почки здоровых животных) отличаются значения массы почек в группах 2 и 4 (Рис. 52), что дополнительно подтверждает наличие в них метастаз.

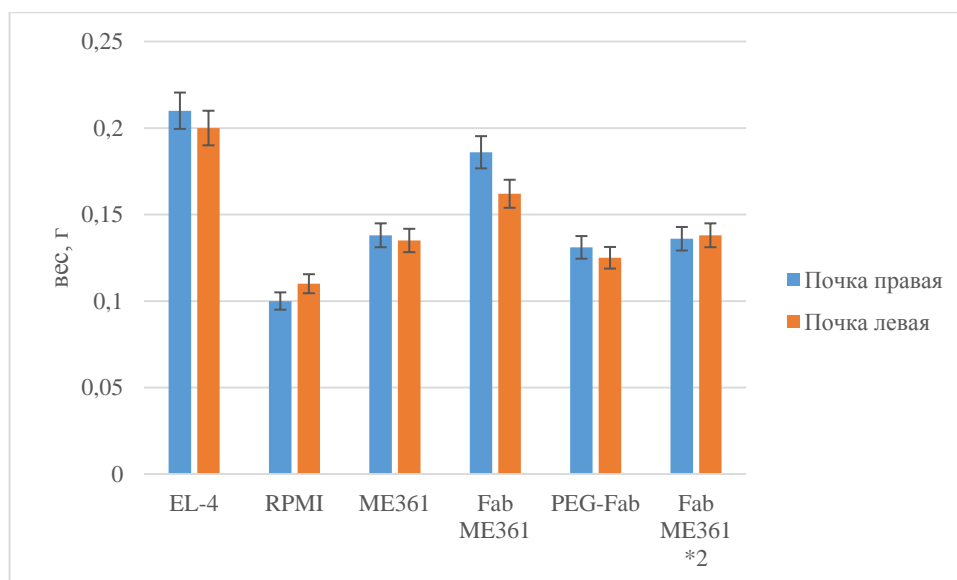


Рисунок 52. Сравнение веса почек опытных животных.

Обширное метастазирование в печени наблюдалось только у животных в группе 2, которым прививали клетки лимфомы EL-4 и не производили последующей терапии. При этом по сравнению с контрольными животными (группа 1), печень животных из группы 2 существенно увеличивалась в объеме и приобретала специфический сероватый оттенок (Рисунок 53 Б). При этом по массе печень животных из группы 2 не существенно отличалась от печени контрольных животных из группы 1.

А)



Б)



Рисунок 53. Общий вид лабораторных животных из группы, не получавшей GD2-связывающие антитела или их фрагменты (Б) и группы, получавшей монопегилированные фрагменты GD2-специфичных моноклональных антител (А).

Также слабо выраженные метастазы визуально определялись в печени животных из группы 4, которым однократно вводили Fab-фрагменты через 7 дней после прививания опухолевых клеток. Изменений по массе печени в данном случае не выявилось.

Следует отметить, что в группах 3, 5, и 6 метастазы встречались значительно реже, причем у животных группы 3 их обнаружено не было ни в почках, ни в печени. Это свидетельствует об эффективности терапии GD2-специфичными моноклональными антителами перевиваемой опухоли у мышей.

При сравнении групп 4, 5 и 6 следует отметить тот факт, что Fab-фрагменты оказывают существенный противоопухолевый эффект. Причем наименьший эффект показала однократная доза не модифицированных Fab-фрагментов, с выраженными метастазами и в печени, и в почках, что обусловлено их коротким временем полужизни. 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 усиливать положительный противоопухолевый эффект в системе *in vivo*. Вероятно, это связано в первую очередь с увеличенным временем циркуляции в организме.

4.1.11 Заключение и 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.

5. Список сокращений

ГСЛ	Гликофинголипиды
мАт	Моноклональные антитела
ПЭГ	Полиэтиленгликоль
ADC	Конъюгат антитело-лекарственный препарат
ADCC	Антителозависимая клеточная цитотоксичность
AICD	Преципитат-активированная гибель индуцированных Т-клеток
AVD	Апоптотическое уменьшение объёма клетки
CAR	Химерные рецепторы антигенов
CD	Кластер дифференциации
CDC	Комплемент зависимая цитотоксичность
CDR	Гипервариабельный участок
CEA	Раково-эмбриональный антиген
Cys	Цистеин
c-Src	Прото-онкоген тирозин-протеинкиназы Src
EGFR	Рецептор эпидермального фактора роста
ELISA	Иммуноферментный анализ
EpCAM	Молекулы адгезии эпителиальных клеток
EPHA3	Рецептор эфрина А3
Fab	Участок связывания антигена иммуноглобулина
FACs	Флуоресцентно-активированная сортировка клеток
FADD	Fas-ассоциированный белок с доменом смерти
FAK	Фокальные адгезионные киназы
FAP	Белок, активирующий фибробласты
Fc	Кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина
FDA	Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов США
Gal	Галактоза
G-CSF	Колонiestимулирующий фактор гранулоцитов
GD2	GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
GD3	NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
GD1a	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
GD1b	Gal β 1-3GalNAc β 1-4[NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3]Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
GM-CSF	Гранулоцитарно-макрофагальный колонiestимулирующий фактор
GM1	Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1Cer

GM3	NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
GM4	NeuAc α 2-3Gal β 1-1Cer
HAMA	Человеческие анти-мышинные антитела
HER2	Рецептор эпидермального фактора роста человека 2
HGFR	Рецептор фактора роста гепатоцитов
Ig	Иммуноглобулин
IGF1R	Рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 типа
И	Интерлейкин
KLH	Гемоцианин улитки
PBS	Фосфатно-солевой буфер
RIT	Радиоиммунотерапия
scFv	Оноцепочечные фрагменты переменных областей антитела
SCLC	Мелкоклеточный рак легких
SSEA-4	Стадиейспецифический эмбриональный антиген-4
ST	Сиалил трансфераза
TNF	Фактор некроза опухолей
TRAIL	TNF-связанный апоптоз-стимулирующий лиганд
VEGF	Фактор роста эндотелия сосудов

6. Благодарности

Автор выражает огромную благодарность коллективу группы липидных модуляторов иммунитета, а также лаборатории клеточных взаимодействий ИБХ РАН, в особенности, научному руководителю, Холоденко Роману Васильевичу за неоценимую помощь в реализации данной работы на всех её этапах. Автор очень признателен Молотковской И.М., Холоденко И.В., Свирщевской Е.В., Луценко Г.В., Шевченко М.А., за ценные методические советы и помощь в ходе работы. Автор выражает отдельную благодарность Антиповой Н.В. за помощь в получении клеток гибридомы 9P-L1, Рязанцеву Д.Ю. за помощь в оптимизации условий наращивания продуцентов scFv-фрагментов антител 3F8, Ефремову М.А. за помощь в хроматографической очистке антител и их производных, Болховитиной Е.Л. за помощь в работе с лабораторными животными, а также Вишняковой П.А. за всестороннюю поддержку в ходе выполнения данной работы.

Отдельно хочется выразить благодарность дирекции и администрации ИБХ РАН за создание благоприятных условий и атмосферы для научных исследований.

7. Список литературы

1. С.М. Деев, Е.Н. Лебедеенко, Л.Е. Петровская, Д.А. Долгих, А.Г. Габибов, М.П. Кирпичников. *Неприродные антитела и иммуноконъюгаты с заданными свойствами: оптимизация функций через направленное изменение структуры*. Успехи химии, 2015. **84** (1): стр. 1-26.
2. Andrew M. Scott, Jedd D. Wolchok & Lloyd J. Old. *Antibody therapy of cancer*. Nature Reviews Cancer, 2012. **12**: p. 278-287.
3. Овчинников Ю.А. *Основы биоорганической химии*, 1989. с. 534-535.
4. Schnaar R.L., B. Ernst, G.W. Hart, P. Sina (Eds.), *Glycobiology of the nervous system: Carbohydrates in Chemistry and Biology, Part II: Biology of Saccharides*. Wiley-VCH, Weinheim, 2000. p. 1013–1027.
5. Stults C.L., Sweeley C.C., Macher B.A. *Glycosphingolipids: structure, biological source, and properties*. Methods Enzymol, 1989. **179**: p. 167–214.
6. Blaschke A.J., Staley K., Chun J. *Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex*. Development, 1996. **122** (4): p. 1165-1174.
7. Simons K., Ikonen E. *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**: p. 569–572.
8. Mutoh T., Tokuda A., Miyadai T., Hamaguchi M., Fujiki N. *Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995. **92** (11): p. 5087-5091.
9. Ono M., Handa K., Sonnino S., Withers D.A., Nagai H., Hakomori S. *GM3 ganglioside inhibits CD9-facilitated hypotactic cell motility: co expression of GM3 and CD9 is essential in the down regulation of tumor cell motility and malignancy*. Biochemistry, 2001. **40** (21): p. 6414-6421.
10. Iwabuchi K., Handa K., Hakomori S. *Separation of “glycosphingolipid signaling domain” from caveolin-containing membrane fraction in mouse melanoma B16 cells and its role in cell adhesion coupled with signaling*. J. Biol. Chem., 1998. **273** (50): p. 33766-33773.
11. Cheresch DA, Harper JR, Schulz G, Reisfeld RA. *Localization of the gangliosides GD2 and GD3 in adhesion plaques and on the surface of human melanoma cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984. **81**: p. 5767–5771.
12. Ledeen R.W., Wu G. *Nuclear sphingolipids: metabolism and signaling*. J Lipid Res., 2008 **49** (6): p. 1176-1186.
13. Niimi K1, Nishioka C, Miyamoto T, Takahashi E, Miyoshi I, Itakura C, Yamashita T. *Impairment of neuropsychological behaviors in ganglioside GM3-knockout mice*. Biochem Biophys Res Commun. 2011. **25** (4): p. 524-8.
14. Okada M1, Itoh Mi M, Haraguchi M, Okajima T, Inoue M, Oishi H, Matsuda Y, Iwamoto T, Kawano T, Fukumoto S, Miyazaki H, Furukawa K, Aizawa S, Furukawa K. *b-series ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve*. 2002. **18** (3): p. 1633-6.

-
15. Yamashita T, Wu YP, Sandhoff R, Werth N, Mizukami H, Ellis JM, Dupree JL, Geyer R, Sandhoff K, Proia RL. *Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glia interactions*. Proc Natl Acad Sci USA. 2005. 22 (8): p. 2725-30.
 16. Yu R.K., Tsai Y.T., Ariga T., Yanagisawa M. *Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides*. J Oleo Sci., 2011. 60 (10): p. 537-544.
 17. Yanagisawa M1, Yoshimura S, Yu RK. *Expression of GD2 and GD3 gangliosides in human embryonic neural stem cells*. ASN Neuro. 2011 3 (2). pii: e00054.
 18. Ladisch S., Wu Z.L. *Detection of a tumour-associated ganglioside in plasma of patients with neuroblastoma*. Lancet . 1985. 19 (1): p. 136-138.
 19. Hoon D.S., Okun E., Neuwirth H., Morton D.L., Irie R.F. *Aberrant expression of gangliosides in human renal cell carcinomas*. J. Urol. 1993. 15: p. 2013–2018.
 20. Sondel P.M., Hank J.A. *Antibody-directed, effector cell-mediated tumor destruction*. Hematol. Oncol. 2001. 15 (4): p.703–721.
 21. Hamilton W.B., Helling F., Lloyd K.O., Livingston P.O. *Ganglioside expression on human malignant melanoma assessed by quantitative immune thin-layer chromatography*. Int. J. Cancer, 1993. 53 (4): p. 566-573.
 22. Дятловицкая Э.В., Кандыба А.Г. *Сфинголипиды в метастазировании и ангиогенезе опухолей*. Биохимия, 2006. 71 (4): с. 437-444.
 23. Iwabuchi K, Yamamura S, Prinetti A, Handa K, Hakomori S. *GM3-enriched microdomain involved in cell adhesion and signal transduction through carbohydrate-carbohydrate interaction in mouse melanoma B16 cells*. J Biol Chem., 1998. 273(15): p. 9130-8.
 24. Bernhard H., Meyer zum Buschenfelde K.H., Dippold W.G. *Ganglioside GD3 shedding by human malignant melanoma cells*. Int. J. Cancer., 1989, 44(1): p. 155-160.
 25. Chang F., Li R., Ladisch S. *Shedding of gangliosides by human medulloblastoma cells*. Exp. Cell Res. 1997. 234(2): p. 341-346.
 26. Valentino L., Moss T., Olson E., Wang H.J., Elashoff R., Ladisch S. *Shed tumor gangliosides and progression of human neuroblastoma*. Blood, 1990. v. 75(7): p. 1564-1567.
 27. Birklé S., Zeng G., Gao L., Yu RK., Aubry J. *Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression*. Biochimie. 2003. 85: p. 455–463.
 28. Li R., Gage D., McKallip R., Ladisch S. *Structural characterization and in vivo immunosuppressive activity of neuroblastoma GD2*. Glycoconj. J. 1996. 13(3): p. 385-389.
 29. Olshefski R., Ladisch S. *Intercellular transfer of shed tumor cell gangliosides*. FEBS Lett., 1996. 386(1): p. 11-14.
 30. Дятловицкая Э.В., Кандыба А.Г.. *Сфинголипиды в метастазировании и ангиогенезе опухолей*. Биохимия. 2006. 71(4): с. 437-444.

-
31. Martinez C., Hofmann T.J., Marino R., Dominici M., Horwitz E.M. *Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: A novel surface marker for the identification of MSCs*. Blood, 2007, **109**: 4245-4248.
 32. Ahmed, M. and N.K. Cheung, *Engineering anti-GD2 monoclonal antibodies for cancer immunotherapy*. FEBS Lett, 2014. **588**(2): p. 288-97.
 33. Liang, Y.J., et al., *Differential expression profiles of glycosphingolipids in human breast cancer stem cells vs. cancer non-stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(13): p. 4968-73.
 34. Yamashiro S, Ruan S, Furukawa K, Tai T, Lloyd KO, Shiku H, Furukawa K. *Genetic and enzymatic basis for the differential expression of GM2 and GD2 gangliosides in human cancer cell lines*. Cancer Res., 1993. **53**(22): p. 5395-400.
 35. Shibuya, H., et al., *Enhancement of malignant properties of human osteosarcoma cells with disialyl gangliosides GD2/GD3*. Cancer Sci, 2012. **103**(9): p. 1656-64.
 36. Cazet, A., et al., *The ganglioside G(D2) induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the G(D3) synthase*. Glycobiology, 2012. **22**(6): p. 806-816.
 37. Aixinjueluo, W., et al., *Mechanisms for the apoptosis of small cell lung cancer cells induced by anti-GD2 monoclonal antibodies: roles of anoikis*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29828-36.
 38. Cheever, M.A., et al., *The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(17): p. 5323-37.
 39. Kim SK, Wu X, Ragupathi G, et al. *Impact of minimal tumor burden on antibody response to vaccination*. Cancer Immunol Immunother 2011. **60**: p. 621-7.
 40. Ragupathi G, Livingston PO, Hood C, et al. *Consistent antibody response against ganglioside GD2 induced in patients with melanoma by a GD2 lactone-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine plus immunological adjuvant QS-21*. Clin Cancer Res 2003. **9**: p. 5214-20
 41. Bitton R.J., Guthmann M.D., Gabri M.R., Carnero A.J.L., Alonso D.F., Fainboim L., Gomez D.E. *Cancer vaccines: an update with special focus on ganglioside antigens*. Oncol. Rep., 2002, **9**(2): p. 267-276.
 42. Sen G, Chakraborty M, Foon K, et al. *Preclinical evaluation in nonhuman primates of murine monoclonal antiidiotype antibody that mimics the disialoganglioside GD2*. Clin Cancer Res 1997. **3**: p.1969-76.
 43. Foon KA, Lutzky J, Baral RN, et al. *Clinical and immune responses in advanced melanoma patients immunized with an anti-idiotype antibody mimicking disialoganglioside GD2*. J Clin Oncol 2000. **18**: p. 376-84.

-
44. Niederkorn JY, Mellon J, Pidherney M, Mayhew E, Anand R. *Effect of anti-ganglioside antibodies on the metastatic spread of intraocular melanomas in a nude mouse model of human uveal melanoma.* Curr Eye Res. 1993. **12**(4): p. 347-58.
45. Kuus-Reichel K., Grauer LS., Karavodin LM., Knott C., Krusemeier M., Kay NE. *Will immunogenicity limit the use, efficacy, and future development of therapeutic monoclonal antibodies?* Clin.Diagn. Lab.Immunol. 1994. **1**(4): p. 365–372.
46. Lonberg, N. *Human antibodies from transgenic animals.* Nat. Biotechnol. 2005. **23**: p. 1117–1125.
47. Nelson, A.L. and J.M. Reichert, *Development trends for therapeutic antibody fragments.* Nat Biotechnol, 2009. **27**(4): p. 331-7.
48. I Zafir-Lavie, Y Michaeli and Y Reiter. *Novel antibodies as anticancer agents.* Oncogene. 2007. **26**: p. 3714–3733.
49. Heijnen, I.A. & van de Winkel, J.G. *Human IgG Fc receptors.* Int. Rev. Immunol. 1997. **16**: p. 29–55.
50. Bhat R, Watzl C. *Serial killing of tumor cells by human natural killer cells -enhancement by therapeutic antibodies.* PLoS ONE. 2007. **2**: p. 1–7.
51. Adams GP, Weiner LM. *Monoclonal antibody therapy of cancer.* Nat Biotechnol. 2005. **9**: p. 1147-57.
52. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, SakuradaMet al. *The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity.* J BiolChem . 2003. **278**: p. 3466–3473.
53. Kubota,T. *Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions.* Cancer Sci. 2009. **100**: p. 1566–1572
54. Preithner S, Elm S, Lippold S, Locher M, Wolf A, da Silva AJ et al. *High concentrations of therapeutic IgG1 antibodies are needed to compensate for inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by excess endogenous immunoglobulin G.* MolImmunol. 2006. **43**: p. 1183–1193.
55. Asnacios, A., Naveau, S. & Perlemuter, G. *Gastrointestinal toxicities of novel agents in cancer therapy.* Eur. J. Cancer, 2009. **45**: p. 332–342.
56. Friedman, H. S. *et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma.* J. Clin. Oncol. 2009, **27**: p. 4733–4740.
57. Oldham RK, Dillman RO. *Monoclonal antibodies in cancer therapy: 25 years of progress.* J Clin Oncol. 2008, **26**(11): p. 1774-7.

-
58. Hudis CA. *Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice*. N Engl J Med. 2007, **357**: p. 39-51.
59. Hansel, T.T., et al., *The safety and side effects of monoclonal antibodies*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(4): p. 325-38.
60. Liddell JM. *Production strategies for antibody fragment therapeutics*. BioPharm Int 2009. **2**: p. 36–42.
61. Labrijn AF, Aalberse RC, Schuurman J. *When binding is enough: nonactivating antibody formats*. Curr Opin Immunol, 2009. **20**: p. 479–485.
62. Cheung NK, Cheung IY, Kushner BH, et al. *Murine anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 combined with granulocyte-macrophage colonystimulating factor and 13-cis-retinoic acid in high-risk patients with stage 4 neuroblastoma in first remission*. J Clin Oncol 2012, **30**: p. 3264-70
63. Navid, F., V.M. Santana, and R.C. Barfield, *Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors*. Curr Cancer Drug Targets, 2010. **10**(2): p. 200-9.
64. 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**: С. 79-83.
65. Suzuki M1, Cheung NK. *Disialoganglioside GD2 as a therapeutic target for human diseases*. Expert Opin Ther Targets. 2015, **19**(3): p. 349-62.
66. С.М. Деев, Е.Н. Лебедеенко. *Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения*. Acta Naturae, 2009. **1**: стр. 32 – 49.
67. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
68. Cheung, N.K., et al., *Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells*. Cancer Res, 1985. **45**(6): p. 2642-9.
69. Cerato, E., et al., *Variable region gene segments of nine monoclonal antibodies specific to disialogangliosides (GD2, GD3) and their O-acetylated derivatives*. Hybridoma, 1997. **16**(4): p. 307-16.
70. Mujoo, K., et al., *Disialoganglioside GD2 on human neuroblastoma cells: target antigen for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity and suppression of tumor growth*. Cancer Res, 1987. **47**(4): p. 1098-104.
71. Young, W.W., Jr., et al., *Production of monoclonal antibodies specific for two distinct steric portions of the glycolipid ganglio-N-triosylceramide (asialo GM2)*. J Exp Med, 1979. **150**(4): p. 1008-19.

-
72. Horwacik, I., et al., *Analysis and optimization of interactions between peptides mimicking the GD2 ganglioside and the monoclonal antibody 14G2a*. Int J Mol Med, 2011. **28**(1): p. 47-57.
73. Aina, O.H., et al., *From combinatorial chemistry to cancer-targeting peptides*. Mol Pharm, 2007. **4**(5): p. 631-51.
74. Huang, J., B. Ru, and P. Dai, *Bioinformatics resources and tools for phage display*. Molecules, 2011. **16**(1): p. 694-709.
75. Johnson, M.A. and B.M. Pinto, *Structural and functional studies of Peptide-carbohydrate mimicry*. Top Curr Chem, 2008. **273**: p. 55-116.
76. Popkov, M., et al., *Epitope-specific antibody response to HT-1080 fibrosarcoma cells by mimotope immunization*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(9): p. 3629-35.
77. El Kasmi, K.C., et al., *Crossreactivity of mimotopes and peptide homologues of a sequential epitope with a monoclonal antibody does not predict crossreactive immunogenicity*. Vaccine, 1999. **18**(3-4): p. 284-90.
78. Qiu, J., et al., *Towards the development of peptide mimotopes of carbohydrate antigens as cancer vaccines*. Hybridoma, 1999. **18**(1): p. 103-12.
79. Monzavi-Karbassi, B., et al., *Preclinical studies of carbohydrate mimetic peptide vaccines for breast cancer and melanoma*. Vaccine, 2007. **25**(16): p. 3022-31.
80. Cheung, N.K., et al., *Humanizing murine IgG3 anti-GD2 antibody m3F8 substantially improves antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity while retaining targeting in vivo*. Oncoimmunology, 2012. **1**(4): p. 477-486.
81. Modak, S. and N.K. Cheung, *Disialoganglioside directed immunotherapy of neuroblastoma*. Cancer Invest, 2007. **25**(1): p. 67-77.
82. Kushner, B.H., et al., *Successful multifold dose escalation of anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 in patients with neuroblastoma: a phase I study*. J Clin Oncol, 2011. **29**(9): p. 1168-74.
83. Frost, J.D., et al., *A phase I/IB trial of murine monoclonal anti-GD2 antibody 14.G2a plus interleukin-2 in children with refractory neuroblastoma: a report of the Children's Cancer Group*. Cancer, 1997. **80**(2): p. 317-33.
84. Thurin, J., et al., *Monoclonal antibody-defined correlations in melanoma between levels of GD2 and GD3 antigens and antibody-mediated cytotoxicity*. Cancer Res, 1987. **47**(5): p. 1229-33.
85. Pichla, S.L., R. Murali, and R.M. Burnett, *The crystal structure of a Fab fragment to the melanoma-associated GD2 ganglioside*. J Struct Biol, 1997. **119**(1): p. 6-16.
86. Yu, A.L., et al., *Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(14): p. 1324-34.

-
87. Isaacs JD, Greenwood J, Waldmann H. *Therapy with monoclonal antibodies. II. The contribution of Fc gamma receptor binding and the influence of C(H)1 and C(H)3 domains on in vivo effector function.* J Immunol, 1998. **161**: p. 3862-3869.
88. Navid F, Sondel PM, Barfield R, Shulkin BL, Kaufman RA, Allay JA, Gan J, Hutson P, Seo S, Kim K, Goldberg J, Hank JA, Billups CA, Wu J, Furman WL, McGregor LM, Otto M, Gillies SD, Handgretinger R, Santana VM. *Phase I trial of a novel anti-GD2 monoclonal antibody, Hu14.18K322A, designed to decrease toxicity in children with refractory or recurrent neuroblastoma.* J Clin Oncol. 2014. **32**(14): p. 1445-52.
89. Cheung, N.K., Guo, H., Hu, J., Tassev, D.V. and Cheung, I.Y. *Humanizing murine IgG3 anti-GD2 antibody m3F8 substantially improves antibody dependent cell-mediated cytotoxicity while retaining targeting in vivo.* OncoImmunology, 2012. **1**: p. 477-486.
90. Irie RF, Morton DL. *Regression of cutaneous metastatic melanoma by intralesional injection with human monoclonal antibody to ganglioside GD2.* Proc Natl Acad Sci USA. 1986. **83**(22): p. 8694-8.
91. Brignole, C., et al., *Immune cell-mediated antitumor activities of GD2-targeted liposomal c-myc antisense oligonucleotides containing CpG motifs.* J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(15): p. 1171-80.
92. Zeng, Y., et al., *Fractalkine (CX3CL1)- and interleukin-2-enriched neuroblastoma microenvironment induces eradication of metastases mediated by T cells and natural killer cells.* Cancer Res, 2007. **67**(5): p. 2331-8.
93. Otto, M., et al., *Combination immunotherapy with clinical-scale enriched human gammadelta T cells, hu14.18 antibody, and the immunocytokine Fc-IL7 in disseminated neuroblastoma.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(23): p. 8486-91.
94. Gillies, S.D., Reilly, E.B., Lo, K.M. and Reisfeld, R.A. (1992) *Antibody-targeted interleukin 2 stimulates T-cell killing of autologous tumor cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. **89**: p. 1428-1432.
95. Ravindranath, M.H., et al., *Interleukin-2 binds to ganglioside GD(1b).* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **283**(2): p. 369-73.
96. Albertini, M.R., et al., *Phase II trial of hu14.18-IL2 for patients with metastatic melanoma.* Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(12): p. 2261-71
97. Metelitsa, L.S., Gillies, S.D., Super, M., Shimada, H., Reynolds, C.P. and Seeger, R.C. *Antidisialoganglioside/granulocyte macrophage-colonystimulating factor fusion protein facilitates neutrophil antibody-dependent cellular cytotoxicity and depends on Fc gamma RII (CD32) and Mac-1 (CD11b/CD18) for enhanced effector cell adhesion and azurophil granule exocytosis.* Blood. 2002. **99**: p. 4166-4173.

-
98. Mortier, E., et al., *Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R alpha fusion proteins.* J Biol Chem, 2006. **281**(3): p. 1612-9.
99. Vincent, M. et al. *Tumor targeting of the IL-15 superagonist RLI by an anti-GD2 antibody strongly enhances its antitumor potency.* Int. J. Cancer. 2013. **133**: p. 757–765.
100. Wargalla, U.C. and Reisfeld, R.A. (1989) *Rate of internalization of an immunotoxin correlates with cytotoxic activity against human tumor cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. **86**: p. 5146–5150.
101. Mujoo, K., Reisfeld, R.A., Cheung, L. and Rosenblum, M.G. *A potent and specific immunotoxin for tumor cells expressing disialoganglioside GD2.* Cancer Immunol. Immunother. 1991. **34**: p. 198–204.
102. Thomas, P.B., et al., *Effective targeted cytotoxicity of neuroblastoma cells.* J Pediatr Surg, 2002. **37**(3): p. 539-44.
103. Tur M.K. et al. *An anti-GD2 single chain Fv selected by phage display and fused to Pseudomonas exotoxin A develops specific cytotoxic activity against neuroblastoma derived cell lines.* Int. J. Mol. Med. 2001. **8**: p. 579–584.
104. Lode, H.N., Reisfeld, R.A., Handgretinger, R., Nicolaou, K.C., Gaedicke, G. and Wrasidlo, W. *Targeted therapy with a novel enediyene antibiotic calicheamicin theta(I)1 effectively suppresses growth and dissemination of liver metastases in a syngeneic model of murine neuroblastoma.* Cancer Res. 1998. **58**: p. 2925–2928.
105. Modak, S. and N.K. Cheung, *Antibody-based targeted radiation to pediatric tumors.* J Nucl Med, 2005. **46 Suppl 1**: p. 157S-63S.
106. Pastorino, F., et al., *Nanocarrier-mediated targeting of tumor and tumor vascular cells improves uptake and penetration of drugs into neuroblastoma.* Front Oncol, 2013. **3**: p. 190.
107. Водовозова Е.Л., Назарова А.И., Феофанов А.В., Холоденко Р.В., Пазынина Г.В., Гаенко Г.П., Бовин Н.В., Молотковский Ю.Г. “*Взаимодействие липосом, несущих углеводные детерминанты, с клетками меланомы*”. Биол. Мембраны, 2004, **21**(1): С. 53-64.
108. Raffaghello L., et al., *In vitro and in vivo antitumor activity of liposomal Fenretinide targeted to human neuroblastoma.* Int J Cancer, 2003. **104**(5): p. 559-67
109. Di Paolo, D., et al., *Neuroblastoma-targeted nanoparticles entrapping siRNA specifically knockdown ALK.* Mol Ther, 2011. **19**(6): p. 1131-40.
110. Adrian, J.E., Wolf, A., Steinbach, A., Rossler, J. and Suss, R. *Targeted delivery to neuroblastoma of novel siRNA-anti-GD2-liposomes prepared by dual asymmetric centrifugation and sterol-based post-insertion method.* Pharm. Res. 2011. **28**: p. 2261–2272.

-
111. Shen, M., et al., *An MRI-visible non-viral vector for targeted Bcl-2 siRNA delivery to neuroblastoma*. Int J Nanomedicine, 2012. **7**: p. 3319-32
112. Yankelevich, M., et al., *Anti-CD3 x anti-GD2 bispecific antibody redirects T-cell cytolytic activity to neuroblastoma targets*. Pediatr Blood Cancer, 2012. **59**(7): p. 1198-205.
113. Cochonneau D., et al., *Cell cycle arrest and apoptosis induced by O-acetyl-GD2-specific monoclonal antibody 8B6 inhibits tumor growth in vitro and in vivo*. Cancer Lett, 2013. **333**(2): p. 194-204.
114. Lo, A.S., et al., *Anti-GD3 chimeric sFv-CD28/T-cell receptor zeta designer T cells for treatment of metastatic melanoma and other neuroectodermal tumors*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(10): p. 2769-80.
115. Louis, C.U., et al., *Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma*. Blood, 2011. **118**(23): p. 6050-6.
116. Холоденко Р.В. *Апоптозиндуцирующая активность моноклональных антител 14G2a к опухолевому ганглиозиду GD2 в Т-клеточной лимфоме EL-4*. Современные проблемы венерологии, иммунологии и врачебной косметологии. 2010. **1**(08): стр. 17-23.
117. Nakamura K, Hanibuchi M, Yano S, Tanaka Y, Fujino I, Inoue M, Takezawa T, Shitara K, Sone S, Hanai N. *Apoptosis induction of human lung cancer cell line in multicellular heterospheroids with humanized antiganglioside GM2 monoclonal antibody*. Cancer Res. 1999, **59**: p. 5323–5330.
118. Molotkovskaya IM, Kholodenko RV, Molotkovsky JG. *Influence of gangliosides on the IL-2- and IL-4-dependent cell proliferation*. Neurochem Res 2002, **27**:761–770.
119. Maria D, Lenti L, Malisan F, d'Agostino F, Tomassini B, Zeuner A, Rippo MR, Testi R: *Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide induced apoptosis*. Science. 1997. **277**: p. 1652–1655.
120. Cheresh, D. A., and Klier, F. G. *Disialoganglioside GD2 distributes preferentially into substrate-associated microprocesses on human melanoma cells during their attachment to fibronectin*. J. Cell Biol. 1986. **102**: p. 1887–1897
121. Yoshida, S., Kawaguchi, H., Sato, S., Ueda, R., and Furukawa, K. *An anti-GD2 monoclonal antibody enhances apoptotic effects of anti-cancer drugs against small cell lung cancer cells via JNK (c-Jun terminal kinase) activation*. Jpn. J. Cancer Res. 2002. **93**: p. 816–824.
122. S. Yoshida, S. Fukumoto, H. Kawaguchi, S. Sato, R. Ueda, K. Furukawa. *Ganglioside GD2 in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis*. Cancer Res. 2001. **61**: p. 4244–4252.
123. Kowalczyk A, Gil M, Horwacik I, Odrowaz Z, Kozbor D, Rokita H. *The GD2-specific 14G2a monoclonal antibody induces apoptosis and enhances cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in IMR-32 human neuroblastoma cells*. Cancer Lett. 2009. **281**: p. 171–182.

-
124. Hernández AM, Rodríguez N, González JE, Reyes E, Rondón T, Griñán T, Macías A, Alfonso S, Vázquez AM, Pérez R. *Anti-NeuGcGM3 antibodies, actively elicited by idiotypic vaccination in nonsmall cell lung cancer patients, induce tumor cell death by an oncosis-like mechanism.* J Immunol. 2011. **186**: p. 3735–3744.
125. Roque-Navarro L, Chakrabandhu K, de León J, Rodríguez S, Toledo C, Carr A, de Acosta CM, Hueber AO, Pérez R. *Anti-ganglioside antibody-induced tumor cell death by loss of membrane integrity.* Mol Cancer Ther. 2008. **7**: p. 2033–2041.
126. Vishnyakova PA, Doronin II, Kholodenko IV, Ryazantsev DY, Molotkovskaya IM, Kholodenko RV. *Caspases participation in the cell death, induced by GD2-specific monoclonal antibody.* Bioorg Khim. 2014. **40**: p. 1–10.
127. Reichert, J.M. and E. Dhimolea, *The future of antibodies as cancer drugs.* Drug Discov Today, 2012. **17**(17-18): p. 954-63.
128. Sedlacek HH, Seemann G, Hoffmann D, et al. *Antibodies as carriers of cytotoxicity.* In: Huber H, Queiber W, editors. Contributions to Oncology. Basel: Karger, 1992.
129. Beckman RA1, Weiner LM, Davis HM. *Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors.* Cancer. 2007 109(2): p. 170-9.
130. Juweid M, Neumann R, Paik C, Perez-Bacete MJ, Sato J, van Osdol W, Weinstein JN. *Micropharmacology of monoclonal antibodies in solid tumors: direct experimental evidence for a binding site barrier.* Cancer Res. 1992 **52**(19): p. 5144-53.
131. M Lauwereys, M Arbabi Ghahroudi, A Desmyter, J Kinne, W Hölzer, E De Genst, L Wyns, and S Muyldermans. *Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies.* EMBO J. 1998. **17**(13): p. 3512–3520.
132. Kim, S.J., Y. Park, and H.J. Hong, *Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies.* Mol Cells, 2005. **20**(1): p. 17-29.
133. Patrick Chames, Daniel Baty. *Antibody engineering and its applications in tumor targeting and intracellular immunization.* FEMS Microbiology Letters, 2000, **189**: p. 1-8
134. С. М. Деев, Е. Н. Лебедеенко. *Инженерия антител: молекулярный конструктор на основе модуля барназа-барстара.* Биоорг.химия 2009, **35**(6): с. 761-778.
135. Serebrovskaya E.O., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Deyev S.M. *Targeting cancer cells by using an antireceptor antibody-photosensitizer fusion protein.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009 **106**: p. 9221–9225.
- 136 . Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NB, Hamid M. *scFv antibody: principles and clinical application.* Clin Dev Immunol. 2012; Epub 2012 Mar 15.

-
137. J. S. Huston, M. Mudgett-Hunter, M. S. Tai et al. *Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins*. Methods in Enzymology. 1991. **203**: p. 46–88.
138. Whitlow, M., et al., *An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability*. Protein Eng, 1993. **6**(8): p. 989-95.
139. Wang, P.L., B.K. Lo, and G. Winter, *Generating molecular diversity by homologous recombination in Escherichia coli*. Protein Eng Des Sel, 2005. **18**(8): p. 397-404.
140. Zhang, J.L., et al., *Screening and evaluation of human single-chain fragment variable antibody against hepatitis B virus surface antigen*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2006. **5**(2): p. 237-41.
141. McCafferty, J., et al., *Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains*. Nature, 1990. **348**(6301): p. 552-4.
142. Altshuler, E.P., D.V. Serebryanaya, and A.G. Katrukha, *Generation of recombinant antibodies and means for increasing their affinity*. Biochemistry (Mosc), 2010. **75**(13): p. 1584-605
143. M. D. Sheets, P. Amersdorfer, R. Finnern et al. *Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998. **95**(11): p. 6157–6162.
144. Knappik, A., et al., *Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides*. J Mol Biol, 2000. **296**(1): p. 57-86.
145. A. D. Griffiths, S. C. Williams, O. Hartley et al. *Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires*. EMBO Journal, 1994. **13**(14): p. 3245–3260.
146. Hanes, J., et al., *Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(12): p. 1287-92.
147. McWhirter, J.R., et al., *Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(4): p. 1041-6.
148. P. Jurado, V. De Lorenzo, and L. A. Fern´andez, *Thioredoxin fusions increase folding of single chain Fv antibodies in the cytoplasm of Escherichia coli: evidence that chaperone activity is the prime effect of thioredoxin*. Journal of Molecular Biology. 2006. **357**(1): p. 49–61.
149. Lekkerkerker, A. and T. Logtenberg, *Phage antibodies against human dendritic cell subpopulations obtained by flow cytometry-based selection on freshly isolated cells*. J Immunol Methods, 1999. **231**(1-2): p. 53-63.
150. Skerra, A. and A. Pluckthun, *Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli*. Science, 1988. **240**(4855): p. 1038-41.

-
151. S. A. Lesley, High-throughput proteomics: protein expression and purification in the postgenomic world. *Protein Expression and Purification*. 2001. **22**(2): p. 159–164.
152. J. S. Huston, A. J. T. George, M. S. Tai et al. *Single-chain Fv design and production by preparative folding in Antibody Engineering*. Oxford University Press, 1995. p. 185–227.
153. F. Baneyx. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999. **10**(5): p. 411–421.
154. Aavula, S.M., et al., *Generation and Characterization of an scFv Directed against Site II of Rabies Glycoprotein*. *Biotechnol Res Int*, 2011. **2011**: p. 652147.
155. L. Nieba, A. Honegger, C. Krebber, and A. Plückthun. *Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment*. *Protein Engineering*. 1997. **10**(4): p. 435–444.
156. Gattenlohner, S., et al., *A human recombinant autoantibody-based immunotoxin specific for the fetal acetylcholine receptor inhibits rhabdomyosarcoma growth in vitro and in a murine transplantation model*. *J Biomed Biotechnol*, 2010. **2010**: p. 187621
157. Thor Straten, P., et al., *In situ cytokine therapy: redistribution of clonally expanded T cells*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(1): p. 250-8.
158. M. Kuroki, F. Arakawa, P. D. Khare et al. *Specific targeting strategies of cancer gene therapy using a single-chain variable fragment (scFv) with a high affinity for CEA*. *Anticancer Research*. 2000. **20**(6 A): p. 4067–4071.
159. Li, X., et al., *Single-chain antibody-mediated gene delivery into ErbB2-positive human breast cancer cells*. *Cancer Gene Ther*, 2001. **8**(8): p. 555-65.
160. Alvarez, R.D., et al., *A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD21): a phase I trial*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(8): p. 3081-7.
161. Pluen, A., et al., *Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(8): p. 4628-33.
162. Melkko, S., et al., *An antibody-calmodulin fusion protein reveals a functional dependence between macromolecular isoelectric point and tumor targeting performance*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002. **54**(5): p. 1485-90.
163. Kim, M.K., et al., *Improved renal clearance and tumor targeting of 99mTc-labeled anti-Tac monoclonal antibody Fab by chemical modifications*. *Nucl Med Biol*, 2002. **29**(2): p. 139-46.
164. Perez-Atayde, A.R., et al., *Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia*. *Am J Pathol*, 1997. **150**(3): p. 815-21.
165. Jain, M., et al., *Penetratin improves tumor retention of single-chain antibodies: a novel step toward optimization of radioimmunotherapy of solid tumors*. *Cancer Res*, 2005. **65**(17): p. 7840-6.

-
166. Colcher D1, Pavlinkova G, Beresford G, Booth BJ, Choudhury A, Batra SK. *Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies*. Q J Nucl Med. 1998. **42**(4): p. 225-41.
167. Chapman AP, Antoniw P, Spitali M et al *Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives*. Nat Biotechnol 1999. **17**: p. 780–783.
168. Chen C, Constantinou A, Deonarain M. *Modulating antibody pharmacokinetics using hydrophilic polymers*. Expert Opin Drug Deliv, 2011. **8**: p. 1221–1236.
169. Kontermann RE. *Strategies to extend plasma half-lives of recombinant antibodies*. BioDrugs 2009, **23**: p. 93–109.
170. Constantinou A, Epenetos AA, Hreczuk-Hirst D et al. *Modulation of antibody pharmacokinetics by chemical polysialylation*. Bioconjug Chem 2008. **19**: p. 643–650.
171. Jevsevar S, Kunstelj M, Porekar VG. PEGylation of therapeutic proteins. Biotechnol J 2010. **5**: p. 113–128.
172. Kinstler O, Molineux G, Treuheit M et al. *Mono-N-terminal poly(ethylene glycol)-protein conjugates*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**: p. 477–485.
173. Bailon P, Won CY. *PEG-modified biopharmaceuticals*. Expert Opin Drug Deliv, 2009. **6**: p. 1–16.
174. Humphreys DP, Heywood SP, Henry A et al. *Alternative antibody Fab' fragment PEGylation strategies: combination of strong reducing agents, disruption of the interchain disulphide bond and disulphide engineering*. Protein Eng Des Sel, 2007. **20**: p. 227–234.
175. Wakefield I, Peters C, Burkly L et al. *CDP7657, a monovalent Fab PEG anti-CD40L antibody, inhibits immune responses in both HuSCID mice and non-human primates*. Arthritis Rheum 2010. **62**: p. 1245.
176. Vugler A, Sutton D, Marshall D et al. *Blockade of CD40L with a monovalent Fab' PEG monoclonal antibody inhibits disease in the murine collagen-induced arthritis model*. Arthritis Rheum, 2010. **62**: p. 1244.
177. Poirier N, Azimzadeh AM, Zhang T et al. *Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation*. Sci Transl Med 2010. **2**: p. 1710.
178. Jevševar S, Kusterle M, Kenig M. *PEGylation of antibody fragments for half-life extension*. Methods Mol Biol. 2012. **901**: p.233-46.
179. Balan S, Choi JW, Godwin A et al. *Site-specific PEGylation of protein disulfide bonds using a three-carbon bridge*. Bioconjug Chem, 2007. **18**: p. 61–76.
180. Shaunak S, Godwin A, Choi JW et al (2006) *Site-specific PEGylation of native disulfide bonds in therapeutic proteins*. Nat Chem Biol, 2006. **2**: p. 312–313.

-
181. Cheung, N.K., et al., *Single-chain Fv-streptavidin substantially improved therapeutic index in multistep targeting directed at disialoganglioside GD2*. J Nucl Med, 2004. **45**(5): p. 867-77.
182. Orcutt, K.D., et al., *Engineering an antibody with picomolar affinity to DOTA chelates of multiple radionuclides for pretargeted radioimmunotherapy and imaging*. Nucl Med Biol, 2011. **38**(2): p. 223-33.
183. I.I. Doronin, P.A.Vishnyakova, I.V. Kholodenko, E.D. Ponomarev, D.Y. Ryazantsev, I.M. Molotkovskaya, R.V. Kholodenko. *Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells*. BMC Cancer. 2014; **14**:295. doi: 10.1186/1471-2407-14-295.
184. П. А. Вишнякова, И. И. Доронин, И. В. Холоденко, Д. Ю. Рязанцев, И. М. Молотковская, Р. В. Холоденко. *Участие каспаз в клеточной гибели, индуцированной GD2-специфичными антителами*. Биоорганическая химия. 2014, **40** (3): с. 305–314
185. Кониева А.А., Холоденко И.В., Шрагина О.А., Холоденко Р.В., Бурунова В.В., Бибаева Л.В., Ярыгин К.Н., Ярыгин В.Н. *Функциональная оценка мезенхимальных стволовых клеток, меченных магнитными микрочастицами, in vitro и анализ их распределения в организме после трансплантации*. Клеточные технологии в биологии и медицине, 2010, **3**: стр. 147–152.
186. Telford W., Komoriya A., Packard BZ. *Multiparametric Analysis of Apoptosis by Flow and Image Cytometry*. Methods Mol Biol. 2004. **263**. p. 141-60.
- 187 Kholodenko R, Kholodenko I, Sorokin V, Tolmazova A, Sazonova O, Buzdin A. *Anti-apoptotic effect of retinoic acid on retinal progenitor cells mediated by a protein kinase A-dependent mechanism*. Cell Res. 2007. **17**: p. 151-162.
188. 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, **154**(11): с. 661-622, 2012.
189. Холоденко И.В., Буздин А.А., Холоденко Р.В., Байбикова Ю.А., Сорокин В.Ф., Ярыгин В.Н., Свердлов Е.Д. *“Сокультивирование клеток-предшественников сетчатки (КПС) мыши с культурой клеток пигментного эпителия сетчатки влияет на особенности дифференцировки КПС”*. Биохимия, 2006, Т. 71 (7): стр. 945-953.
- 190 . Молотковская И.М, Холоденко Р.В., Зеленова Н.А., Сапожников А.М., Михалев И.И., Молотковский Юл.Г. *Ганглиозиды индуцируют апоптоз клеток цитотоксической линии CTLL-2, но не промиелоцитарной лейкемической линии HL-60*. Биол. Мембраны. 1999. **16**(6): С. 657-666.
191. 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, **4**, стр. 199-203, 2013.

-
192. Sato E, Suzuki T, Hoshi N, Sugino T, Hasegawa H. *Sodium azide induces necrotic cell death in rat squamous cell carcinoma SCC131*. Med Mol Morphol. 2008. (4): p.211-20
193. Bonavida B. *Postulated mechanisms of resistance of B-cell non-Hodgkin lymphoma to rituximab treatment regimens: strategies to overcome resistance*. Semin Oncol. 2014 (5): p. 667-77.
194. Mussel C., Livingston P.O., Ragupathi G., J. *Keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines against cancer: the Memorial Sloan Kettering experience*. CancerRes. Clin. Oncol., 2001. **127** Suppl 2: R20-6.
195. Bortner C.D., Cidlowski J.A. *Life and death of lymphocytes: a volume regulation affair*. Cell Physiol. Biochem. 2011. **28**: p. 1079-1088.
196. Вишнякова П.А., Холоденко Р.В. *Неклассические пути клеточной гибели*. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013 **6**: С. 4-6.
197. Galluzzi L., Vitale I., Abrams JM., Alnemri ES., Baehrecke EH. et al. *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death*. Cell Death Differ. 2012. **19**: p. 107–120.
198. Холоденко И.В., Доронин И.И., Холоденко Р.В. *Опухолевые модели в изучении онкологических заболеваний*. Иммунология, 2013, **5**, стр 282-286.
199. Zhang Z., Кноепф S.M., Ku H., Sansbury H.M., Xie Y., Chahal M.S., Tomlinson S., Meier K.E. *Differential expression of FAK and Pyk2 in metastatic and non-metastatic EL4 lymphoma cell lines*. Clin Exp Metastasis. 2011. **28**. p. 551–565