

УДК 57.088.2

Разработка технологии получения слитного белка на основе моноклонального гуманизированного антитела против опухолевого антигена HER2 и интерферона- α -2b человека из *Nicotiana benthamiana*

© 2019 Е.Н. КОСОБОКОВА^{1,*}, Е.В. ШЕШУКОВА², М.В. ПИНЮГИНА¹, К.М. КОНОПЛИНА¹, В.С. КОСОРУКОВ¹

¹ФГБУ Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115478

²ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991

*e-mail: ekkos@mail.ru

Поступила в редакцию 21.10.2018 г.

После доработки 21.11.2018 г.

Принята к публикации 15.03.2019 г.

Получены слитные белки на основе рекомбинантного интерферона- α -2b человека и моноклонального гуманизированного антитела против опухолевого антигена HER2 с использованием транзиторной экспрессии в *Nicotiana benthamiana*. Проведена оптимизация генетических конструкций для обеспечения эффективной экспрессии и сборки полноценной молекулы целевого иммуноцитокина. Показана зависимость уровня экспрессии от размера линкера между цитокином и антителом в гибридной молекуле. Проведенная модификация последовательности домена интерферона посредством замены остатков цистеина на серин показала незначительное увеличение продукции целевого белка. Сборка полноразмерных молекул слитного белка подтверждена разработанным авторами качественным методом «комбинированного иммуноферментного анализа» (ИФА). Показано сохранение функции аффинного домена в составе слитных белков при взаимодействии с антигеном в ИФА.

Ключевые слова: интерферон- α -2b, онкоантиген HER2, растительная транзиторная экспрессия, рекомбинантные слитные белки

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-2-49-57

Таргетная терапия – одна из актуальных областей в онкологической практике, подразумевающая использование препаратов направленного действия. В контексте таргетной терапии ключевое место занимают моноклональные антитела (моноАТ-Ц), связывающиеся со специфическими рецепторами на поверхности опухолевой клетки. В конце 1990-х гг. в клиническую практику был введен препарат на основе моноАТ-Ц против белковых трансмембранных рецепторов факторов

роста HER2/neu или c-erbB2 – трастузумаб (герцептин: Genetech, Сан-Франциско, Калифорния) [1]. В организме человека HER2 экспрессируется и в здоровых тканях. Однако его гиперэкспрессия наблюдается в 25–30% случаев рака молочной железы (РМЖ) и является прогностическим критерием ускоренного метастазирования и устойчивости к химиотерапии. Действие трастузумаба основано на его высоком сродстве к рецептору HER2/neu, связь с которым предотвращает пролиферацию

Список сокращений: АТ – антитела; ИФА – иммуноферментный анализ; ИФН – интерферон, моноАТ-Ц – моноклональные антитела, генетически сшитые с цитокинами; НК – натуральные киллеры; ОП – оптическая плотность; ПААГ – полиакриламидный гель; РМЖ – рак молочной железы; ADCC – клеточная цитотоксичность; ADCP – антитело-зависимый клеточный фагоцитоз; CDC – комплимент-зависимая цитотоксичность; DAB – 3,3'-диаминобензидин; HER2 – рецептор эпидермального ростового фактора человека; SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) – додецилсульфат натрия; TGB (tris-glycine buffer) – трис-глициновый буфер.

в клетках РМЖ, т.е. механизм действия не предполагает активации иммунной системы. Однако для моноАТ характерны такие эффекторные функции, как антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), комплимент-зависимая цитотоксичность (CDC) и антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) [2, 3].

Одной из основных характеристик злокачественности новообразования является способность опухоли избегать атаки иммунной системы. Натуральные киллеры (НК) обладают мощной цитотоксической активностью, но под воздействием микроокружения опухоли может изменяться их количество и активность [4]. Существует два механизма ухода опухолевых клеток от цитотоксичности НК: подавление эффекторных функций НК и селекция слабоиммуногенных клеток в процессе эволюции опухоли.

Интерферон- α (ИФН- α) относится к семейству интерферонов I типа и является цитокином широкого спектра действия. Противоопухолевая активность ИФН- α (прямая и иммуностимулирующая) была показана как на животных, так и в клинических испытаниях [5]. Напрямую противоопухолевый эффект ИФН- α оказывает посредством подавления пролиферации раковых клеток, запуска апоптоза, подавления экспрессии онкогена *c-myc*, повышения уровня экспрессии гена опухолевого супрессора P53 и главного комплекса гистосовместимости класса I на клеточной поверхности и ингибирования ангиогенеза. К иммуномодулирующим свойствам ИФН- α относятся активация функций Т- и НК-клеток, дендритных клеток и В-клеток, повышение длительности выживания Т-клеток памяти, индукция поляризации Th1 и регуляция экспрессии различных цитокинов и хемокинов. Однако применение ИФН- α в противораковой терапии ограничено системной токсичностью, сопровождающейся рядом побочных эффектов, и коротким периодом полувыведения из крови, как следствие, недостаточным уровнем ИФН- α в области опухоли. Целенаправленное введение препарата в область злокачественного образования лишь частично решает проблему, так как концентрация цитокина в месте введения быстро снижается. Кроме того, часто локализация опухоли или микрометастаз делает невозможным проведение данной процедуры. Из-за сложности манипуляций, технология введения в микроокружение опухоли клеток, продуцирующих цитокины, также не нашла применения в клинике.

Специфические к опухоли моноклональные антитела, генетически сшитые с цитокинами (моноАТ-Ц) являются альтернативным спосо-

бом накопления в области опухоли цитокинов в концентрации достаточной для проявления значительного противоопухолевого эффекта без сопровождаемой системной токсичности. С другой стороны, присутствие ИФН- α в микроокружении опухоли обеспечит активацию иммунной системы и усиление эффекторных функций моноАТ-Ц.

Известно более ста моноАТ-Ц, на основе нескольких цитокинов и антител к различным антигенам, показавших положительные эффекты на моделях животных [6]. Несмотря на это, на фармацевтическом рынке до сих пор нет слитных белков, одобренных для применения в онкологической практике. Однако ряд препаратов проходят клинические испытания на I и II фазах [7]. Предварительные результаты свидетельствуют о серьезной перспективе для таких рекомбинантных белков в качестве противоопухолевых препаратов благодаря ряду преимуществ.

Рекомбинантный слитный белок оказывается в микроокружении опухоли быстрее и в большей относительной концентрации, чем просто цитокин. Присутствие цитокиновых рецепторов на разных нормальных клетках обеспечивает конкуренцию за связывание молекулы слитного белка, что влияет на степень накопления моноАТ-Ц в области злокачественного образования. Тем не менее экспериментально на моделях животных и в клинике было показано, что в области опухоли концентрация моноАТ-Ц выше при введении цитокинов в составе слитной конструкции, чем при системном введении свободных цитокинов. Концентрируясь в основном в области злокачественного образования, моноАТ-Ц оказывают значительно меньший токсический эффект на нормальные органы и ткани. Благодаря связи со специфическим антигеном происходит увеличение времени выведения цитокина из организма, и наблюдается пролонгация терапевтического эффекта.

В работах Morrison [8] описаны слитные белки на основе мышинового ИФН- α и полноразмерного IgG, специфичного, в одном случае, к антигену рака молочной железы HER2/neu, в другом – к антигену В-клеточной лимфомы CD20 [9]. Обе конструкции показали длительное время жизни и противораковую активность на В-клеточной мышиной лимфоме, трансфицированной человеческими антигенами. Данные иммуноцитокينات проявили антипролиферативную и проапоптотическую активность, что привело у мышей к повышению выживаемости и в 87% случаев – к излечиванию.

Rossi et al. были получены конструкции из тетрамерного ИФН- $\alpha 2\beta$, связанные с гуманизированным полноразмерным IgG к антигену В-клеточной лимфомы CD20 (велтузумаб) и с гуманизированным антителом к антигену HLA-DR гематопоэтической опухоли (hL243 IgG1) [10, 11]. Для данных иммуоцитоккинов был показан высокий терапевтический эффект на ксенографтных опухолевых моделях, как предполагают авторы, за счет прямой противоопухолевой активности ИФН- α .

В исследовании Frey et al. описан слитный белок, состоящий из мышинового ИФН- α и одноцепочечного варибельного фрагмента scFv(F8), специфичного к альтернативно сплайсированному домену EDA фибронектина [12]. Несмотря на селективное накопление scFv(F8)-ИФН- α в области опухоли, терапевтический эффект показан незначительный; в качестве возможных причин обсуждаются выбранные тип опухоли (солидный), формат иммуноглобулина и изначальная невысокая чувствительность используемых опухолевых клеточных линий к ИФН- α .

В описанных выше работах гибридные моноАТ-Ц экспрессировали в культурах животных клеток. Получение моноАТ-Ц из растительного продуцента имеет ряд преимуществ, по сравнению с экспрессионными системами на основе клеток животных. Среди них низкая стоимость, высокий уровень экспрессии, простота технологии, низкий риск контаминации патогенными для человека вирусами, микроорганизмами, прионами и онкогенами. С другой стороны, так же, как и животные клетки, в отличие от бактериальной системы экспрессии, они обеспечивали полноразмерную сборку таких сложных молекул, как АТ.

Ранее из *Nicotiana benthamiana* были получены биологически активный рекомбинантный интерферон- $\alpha 2b$ человека [13] и рекомбинантные гуманизированные антитела, специфически взаимодействующие с внеклеточным доменом рецептора эпидермального ростового фактора человека (HER2) [14]. Данная технология подразумевает вставку целевого гена в реплицирующиеся элементы вируса, последующее инфицирование клеток растения, где происходит амплификация, приводящая к накоплению рекомбинантного белка в цитозоли растительной клетки [15, 16]. Полученные фитоантитела аналогичны трастузумабу – антителам, широко используемым онкологами в терапии рака молочной железы. В лабораторных исследованиях было показано, что разработанный препарат обладает схожей с зару-

бежным аналогом – трастузумабом – биологической активностью, с несколько усиленной антитело-зависимой цитотоксичностью.

Антитела являются сложными белками, состоящими из двух пар цепей – легкой и тяжелой. Создание мультидоменных конструкций несет в себе определенные сложности: например, может нарушаться сборка полноразмерных антител в полноценный белок при сохранении уровня экспрессии отдельных компонентов, или могут значительно смещаться уровни экспрессии отдельных компонентов, и тогда процесс сборки нарушается уже как следствие.

Целью настоящего исследования стало получение векторов, обеспечивающих эффективную экспрессию и сборку полноценной молекулы слитного белка.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Клонирование целевого гена в экспрессионные векторы

Все генно-инженерные манипуляции проводили по аналогии с предыдущими работами [13, 14].

Агроинъекция

Агробактерии *A. tumefaciens*, штамм GV3101 (коллекция Лаборатории вирусологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва), трансформированные соответствующими плазмидами, культивировали в течение ночи в 20 мл LB при 28 °С. В ночной культуре оценивали плотность клеток и разбавляли суспензию буферным раствором для агроинъекции (10 мМ MES pH 5,5; 10 мМ MgSO₄ (Helicon, Россия)) до ОП₆₀₀=0,1. Агроинъекцию проводили однократно шприцом без иглы.

Для стимуляции продуктивности и повышения уровня экспрессии вирус-вектора проводили коагроинъекцию с культурой агробактерий, несущих вектор с геном белка p19 из вируса карликовой кустистости томатов [17].

После агроинъекции растения выращивали под биолампами с 16-часовой продолжительностью дня при 22 °С и влажности 60%.

Экстракция целевого белка из листьев *N. benthamiana*

На 5-е сутки после агроинъекции листья собирали, удаляли центральные крупные жилки, биомассу взвешивали, измельчали при помощи куттера CL (Fimar, Италия). В полученную массу

добавляли буферный раствор для экстракции (0,2 М цитрат натрия (Helicon); 0,005 М ЭДТА (Helicon); 0,1%-ный твин-20 (Helicon); pH 8,0), смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч при постоянном перемешивании и центрифугировали 30 мин при 1200 г с целью удаления клеточного дебриса и нерастворимого материала.

Скрининг белка

Для оценки результатов экспрессии применяли стандартный метод Леммли вертикального электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS) в редуцирующих (в присутствии бета-меркаптоэтанола) условиях. Для работы использовали установку Mini Protean II (Bio-Rad, США). Для визуализации белков на ПААГ использовали метод окрашивания 0,2%-ным Coomassie brilliant blue G-250 («ПанЭко», Россия).

Для идентификации ИФН- α использовали Вестерн-блоттинг, который осуществляли методом влажного переноса при помощи установки Mini-VE Blotter (Amersham Biosciences Corp., США). Перенос осуществляли на NC-мембрану (Amersham Biosciences Corp.) в TGB (39 мМ глицин, 48 мМ трис-HCl, 0,1%-ный SDS, 20%-ный метанол) в течение 2 ч при 180 мА. Для забивки мембраны использовали T-TBS (2 мМ трис-HCl, 13,7 мМ NaCl, 0,1%-ный твин-20, pH 7,5–7,6) с 5% BSA (Sigma, США). Проводили гибридизацию с мышиными моноАТ против ИФН- α (ММНА-2, PBL Interferon Source, США) либо с козьими антителами к IgG человека P-GAN IgG («Имтек», Россия) в течение 2 ч при постоянном вращении в гибридайсере. Далее повторяли отмывку в T-TBS и инкубировали с мечеными пероксидазой антителами против Ig мыши («Имтек») в течение 1 ч в гибридайсере. Для проявки антител с пероксидазной активностью использовали DAB (Sigma-Aldrich, Germany).

Эффективность экспрессии оценивали по концентрации белка в экстракте из инфильтрованных листьев, полученном, как описано выше. В отсутствие стандартного образца слитного белка, концентрацию аффинного и цитокинового доменов измеряли отдельно, а затем суммировали. Концентрацию рекомбинантного белка определяли при помощи иммуноферментного анализа (ИФА). Для проведения ИФА использовали наборы «альфа-Интерферон-ИФА» и «IgG общий-ИФА» («Вектор-Бест», Россия). Каждый из образцов анализировался в двух повторах.

Были разработаны два варианта комбинированного ИФА (см. «Результаты»), которые были основаны на одновременном использовании антител как к одному, так и к другому домену слитного белка. Это позволило выяснить, является ли полученный в работе слитный белок полноразмерной молекулой и не влияет ли его конечная структура на доступность обоих доменов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Модификация линкерной последовательности вектора слитного белка

Сборку полноценной молекулы слитного белка осуществляли по схеме, приведенной на рис. 1.

Ранее было показано, что использование 35S промотора обеспечивает высокие уровни экспрессии терапевтически значимых белков в растениях [13, 14]. По аналогии была создана конструкция для экспрессии слитного белка (рис. 2).

В процессе работы было установлено, что векторная система с коротким линкером – GGGGS – дает достаточно низкий уровень удельной экспрессии полноразмерного слитного белка. Низкий уровень экспрессии первой версии векторной системы сочли неудовлетворительным. Предположительно, нарушать сборку антигена в тетра-белок мог довольно крупный домен интерферона на С-конце тяжелой цепи. Одним из

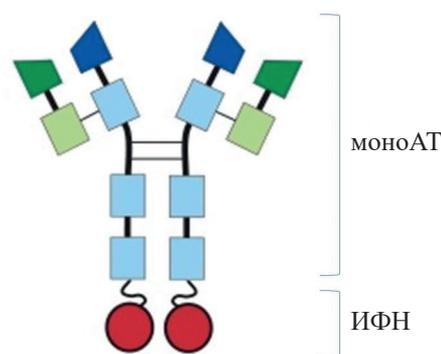


Рис. 1. Схематичное изображение слитного белка: аффинный домен – моноАТ и цитокиновый домен – ИФН. Полноразмерное АТ, состоящее из двух тяжелых (синий цвет) и двух легких (зеленый цвет) цепей; более темным цветом обозначена переменная часть. ИФН представлен двумя молекулами (красные кружки)

Fig. 1. Scheme of the fusion protein construction: affinity domain - monoclonal antibody (mAb) and cytokine domain (IFN): full-length Ab, consisting of two heavy (blue) and two light (green) chains, the darker part is the variable part; the cytokine domain (IFN) is represented in the fusion protein by two molecules (red circle)

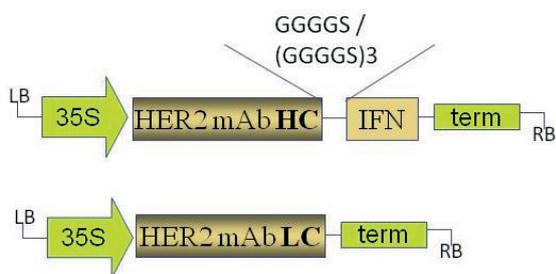


Рис. 2. Схематическое изображение векторных конструкций 35S-pHC-HER2-L6-IFN (тяжелая цепь, содержащая короткий линкер GGGGS), 35S-pHC-HER2-L12-IFN (тяжелая цепь, содержащая длинный линкер (GGGGS)3) и 35S-pLC-HER2 (легкая цепь); 35S – промотор 35S, term – терминатор, IFN – интерферон

Fig. 2. Scheme of the vector constructions 35S-pHC-HER2-L6-IFN (heavy chain containing short linker), 35S-pHC-HER2-L12-IFN (heavy chain containing long linker), 35S-pLC-HER2 (light chain). GGGGS and (GGGGS)3 – short and long linker sequences. 35S – 35S promoter, term – terminator, IFN – interferon

очевидных решений такой проблемы была замена пептидного линкера на более длинный на границе антитело–интерферон.

Методом сайт-мутагенеза была создана модифицированная версия вектора с заменой короткого линкера GGGGS на более длинный (GGGGS)3. Для этого в вектор 35S-pHC-HER2-L6-IFN была введена локальная замена на участок GGTGGA-GGCTCAGGTGGTGGATCCGGAGGTGGCAGT, кодирующая новый вариант линкера.

Правильность вставки была подтверждена методом секвенирования.

Для доставки вирусных векторов в листья растений был использован метод агроинъекции с помощью культуры клеток *A. tumefaciens*, предварительно трансформированной векторными конструкциями.

Для стимуляции продуктивности и повышения уровня экспрессии вектора агроинъекции проводили смесью агробактерий, несущих вектор с геном целевого белка и содержащих ген белка р19 из вируса карликовой кустистости томатов.

Для анализа уровня экспрессии на 5-й день после инфильтрации листья собирали, гомогенизировали и проводили экстракцию целевого продукта.

Был проведен анализ экспрессии векторных систем методом ПААГ-электрофореза с последующим переносом на мембрану для Вестерн-гибридизации с мечеными поликлональными антителами против антител человека (рис. 3).

Было показано, что уровень экспрессии легкой цепи вполне достаточен, а уровень экспрессии тяжелой цепи в обоих вариантах сравнительно невелик, что нарушает возможность сборки полноразмерного комплекса слитного белка в достаточном количестве.

Модификация генетической последовательности домена интерферона в составе слитного белка

Одной из причин невысокого уровня экспрессии могло быть влияние и интерференция остатков цистеина в последовательности домена интерферона и в теле тяжелой цепи антитела. Известно, что модификация интерферона с удалением цистеинов имеет биологическую активность близкую к нативному варианту белка.

Одной из версий улучшения уровня экспрессии гибридной тяжелой цепи с доменом интерферона была модификация последовательности интерферона с мутацией остатков цистеина на серин. Известно, что в некоторых случаях наличие сульфидных связей в рекомбинантном белке может затруднять процесс синтеза. Серин является наиболее

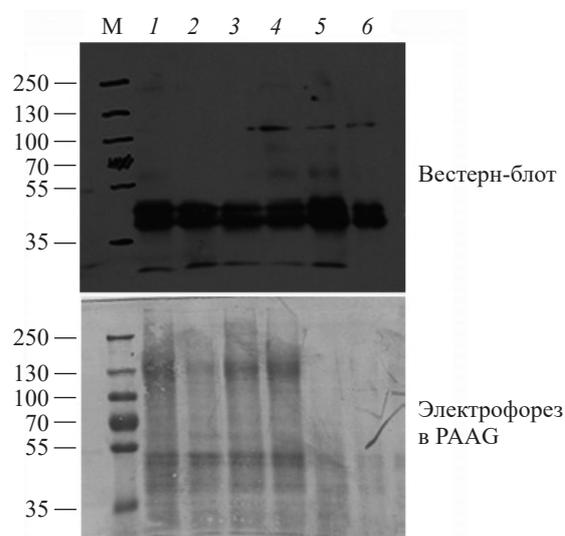


Рис. 3. Вестерн-блот-анализ (сверху) и электрофорез в денатурирующих условиях в 12%-ном ПААГ (снизу) образцов листьев, инфильтрованных различными вариантами сочетаний конструкций 35S-pHC-HER2-L6-IFN (1, 3, 5) и 35S-pHC-HER2-L12-IFN (2, 4, 6) с вектором 35S-pLC-HER2. М – маркер молекулярной массы белков

Fig. 3. Western blot analysis (top) and electrophoresis in 12% PAAG (bottom), denaturing conditions: samples of leaves infiltrated with different variants of combinations of 35S-pHC-HER2-L6-IFN (1, 3, 5) and 35S-pHC-HER2-L12-IFN (2, 4, 6) with 35S-pLC-HER2. M – protein molecular weight marker

TCTGATCTTCCTCAAACCTCATTCTCTTGGTTCTAGAAGGACTCTTATGCTTTTGGCTCAAATGAGAAGGATTTCTCTTTTTTCTTATCTTAAGGATAGACATGATTTTGGTTTCTCAAGAAGAATTCGGTAATCAATTTCAAAGGCTGAAACSTATTCTGTTCTTCATGAAATGATTCAACAGATTTTAACTTTTTTCTACTAAGGATTTCTCTGCTGCA TGGGATGAAACSTTTTTGGATAAGTTTTATACTGAACTTTATCAACAGCTTAATGATCTTGAAGCTTCTGTTATT CAAGGTGTTGGTGTACTGAAACSTCTTATGAAGGAAGATCTATTCTTGGCTGTTAGAAAATTTTTCAAAGA ATTACTCTTTATCTTAAGGAAAAAAGTATTCTCTCTCTGCTTGGGGAAGTTGTTAGAGCTGAAATTATGAGATCT TTTTCTCTTTCTACTAATCTTCAAGAATCTCTTAGATCTAAGGAATGA

Рис. 4. Сайт-специфический мутагенез последовательности домена интерферона в составе слитного белка. Проведены замены азотистого основания гуанина (G) на цитозин (C) в положениях 2, 293 и 413, а также гуанина (G) на аденин (A) в положении 86. Мутации подчеркнуты

Fig. 4. Site-specific mutagenesis of the interferon domain in the fusion protein. The nitrogenous bases of guanine (G) were replaced by cytosine (C) at positions 2, 293 and 413, and also guanine (G) by adenine (A) at position 86

Таблица 1

Оценка уровня экспрессии слитного белка методом ИФА, полученного при использовании разных генетических конструкций, на 5-й день после агроинъекции

Expression level estimation of the fusion protein, obtained using different genetic constructs, performed on the 5th day after agroinjection by ELISA method

Модификации слитного белка	Концентрация, мг/кг листьев
35S-HER2HC-L12-IFN	55
35S-HER2HC-L12-IFNmut	76

оптимальной заменой цистеину, так как аминокислоты имеют похожие пространственные характеристики, различаются только одним атомом и нарушение общей конформации белка не происходит.

Для этого методом сайт-мутагенеза была проведена замена кодонов, кодирующих цистеин, на кодоны, кодирующие серин (рис. 4).

Правильность изменения была подтверждена методом секвенирования. В конструкции использовали последовательность длинного линкера и был получен вектор 35S-HER2HC-L12-IFNmut.

Оценка уровня экспрессии и контроль сборки полноразмерной молекулы слитного белка

Провели агроинфильтрацию системы векторов на основе нового мутантного варианта гена домена интерферона и исследования экспрессии (рис. 5).

Уровень экспрессии и в этом случае был ниже ожидаемого уровня, необходимого для проведения исследований на биологических моделях, хотя и выше, чем в предыдущих вариантах векторных систем (табл. 1).

Надо отметить, что Вестерн-блотинг показал, несколько больший размер тяжелой цепи слитного белка, чем нативного антитела (контрольного образца), что говорит о получении именно тяжелой цепи с доменом интерферона.

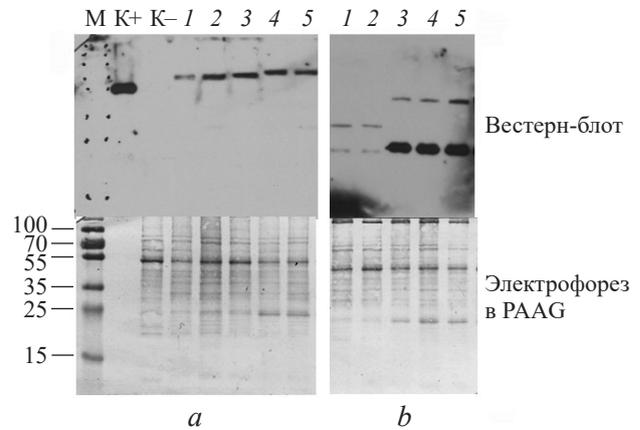


Рис. 5. Вестерн-блот-анализ (вверху) и электрофорез образцов в 12%-ном ПААГ (внизу). *a* – нативные условия. *b* – денатурирующие условия электрофореза. М – маркер молекулярной массы белков; К+ – положительный контроль (40 нг трастузумаба), К– – отрицательный контроль (экстракт листа без инфильтрации), 1–2 – экстракты листьев, продуцирующих антиHER2 антитела, не связанные с интерфероном, 3–5 – экстракт листьев, продуцирующих слитный белок

Fig. 5. Western blot analysis (top) and electrophoresis of samples in 12% PAAG (bottom). *a*, native conditions; *b*, denaturing conditions; K+, positive control (40 ng of trastuzumab); K–, negative control (extract of leaf without infiltration); 1–2, extracts of leaves, producing anti-HER2 antibodies; 3–5, extract of leaves, producing a fusion protein. M, protein molecular weight marker

Для подтверждения сборки полноразмерной молекулы был разработан метод «комбинированного ИФА», в котором одни антитела были аффинны к иммуноглобулинам человека, а вторые – к ИФН-α. Очевидно, что возможно применение данного метода в двух вариантах (рис. 6). При таком подходе специфическая положительная реакция будет наблюдаться только в случае получения полноразмерной конструкции, в которой и аффинный и цитокиновый домены связываются со специфическими антителами. Был успешно использован первый вариант (рис. 7). Данный метод не дал количественных результатов, из-за отсутствия стандартного образца, однако, качественно подтвердил сборку полноразмерной молекулы слитного белка. Положительная реакция наблюдается только в лунках с гибридными молекулами с коротким (антиHER2-L6-IFN) и длинным

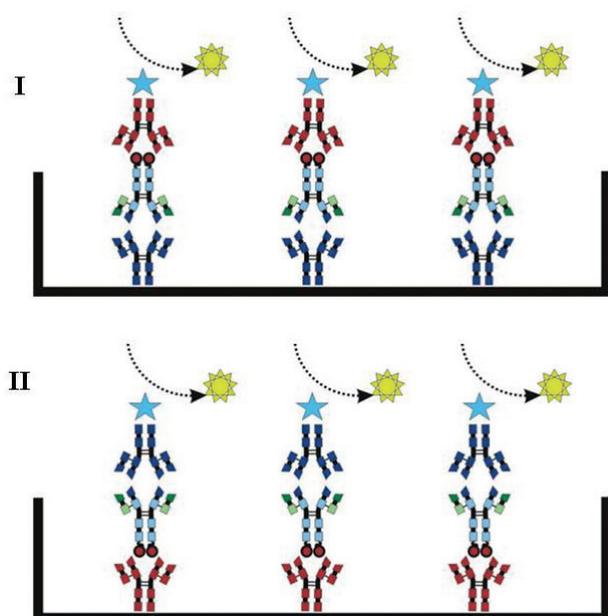


Рис. 6. Варианты комбинированного ИФА: I – в лунке иммобилизованы антитела, аффинные к IgG человека (синие), вторичные антитела, меченные пероксидазой (голубая звездочка), – аффинны к ИФН-α (красные); II – в лунке иммобилизованы антитела, аффинные к ИФН-α (красные), вторичные антитела, меченные пероксидазой (голубая звездочка), – аффинны к IgG человека (синие). Изменение цвета (желтая звездочка) – результат положительной реакции

Fig. 6. Configurations of the combined ELISA: I – antibodies immobilized on the substrate are affine to human immunoglobulin G (blue), secondary antibodies labeled with peroxidase (blue star) are affine to IFN-α (red); II – antibodies immobilized on the substrate are affine to IFN-α, secondary antibodies labeled with peroxidase are affine to human immunoglobulin G. Change color is a result of positive reaction (indicated by yellow star)

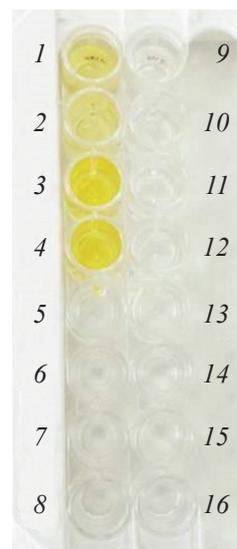


Рис. 7. Результаты комбинированного ИФА (вариант 1). 1, 2 – антиHER2-L6-IFN, 3, 4 – антиHER2-L12-IFN, 5, 6 – антиHER2, выделенный из растений, 7, 8 – «чистые» листья, 9, 10 – IFN, выделенный из растений, 11, 12 – IFN контроль, 13, 14 – буфер для экстракции, 15, 16 – вода

Fig. 7. Results of combined ELISA, configuration I. 1, 2 – antiHER2-L6-IFN; 3, 4 – antiHER2-L12-IFN; 5, 6 – antiHER2, produced in plants; 7, 8 – «clean» leaves; 9, 10 – IFN, produced in plants, 11, 12 – IFN produced in bacteria; 13, 14 – extraction buffer; 15, 16 – water

(антиHER2-L12-IFN) линкерами. Второй вариант, оказался неинформативным для этих целей, так как наблюдалась неспецифическая положительная реакция.

Для количественной оценки использовались стандартные наборы ИФА фирмы «Вектор-Бест» для определения концентрации ИФН-α и общих иммуноглобулинов человека. Каждый набор измерял специфичный ему домен в составе слитного белка. Так как в состав слитного белка цитокин и антитело входят в полноразмерном виде, то молекулярная масса гибридного белка соответствует сумме масс цитокина и антитела, и за количество слитного белка принимали сумму результатов, полученных для АТ и ИФН (см. табл. 1). Адекватность данного подхода подтверждается тем, что определенное количество каждого из доменов соответствует ожидаемому соотношению масс каждого из них, что подтверждает примерно равное молярное количество доменов АТ и ИФН (табл. 2)

Для подтверждения сохранения функциональной активности аффинного домена в гибридной конструкции был использован метод ИФА с иммобилизованным на дне лунки антигеном ERBB2 (HER2/neo) (рис. 8). Изменение окраски

Соотношение долей антител и цитокина в гибридной конструкции

The ratios of antibodies and cytokine in the hybrid construction

Соотношение	моноАТ к HER2	ИФН- α -2b человека
Размер домена, кДа	145	(18,5 × 2)*
Доля домена, %		
расчетная	79,68	20,32
по ИФА	≈ 80	≈ 20

*На одну молекулу АТ приходится две молекулы ИФН (см. рис. 1).

в лунке свидетельствует, во-первых, о взаимодействии аффинной части слитного белка с антигеном, во-вторых, о сборке полноценной молекулы, так как идентификация осуществляется антителами против ИФН- α .

Наличие цветной реакции в лунках свидетельствует как о связывании аффинного домена с антигеном, так и о наличии в молекуле слитного белка ИФН. Данный метод из-за отсутствия стандартного образца может быть исключительно качественным. Однако, при использовании одинаковых количеств слитного белка с коротким и длинным линкером, было зафиксировано более интенсивное свечение во втором случае. Аналогичная разница в интенсивности свечения наблюдалась и при использовании комбинированного ИФА (рис. 7). Полученные результаты подтверди-

ли предположение о том, что при наличии длинного линкера цитокиновый домен не будет оказывать влияние на аффинность иммуноглобулина в гибридной молекуле.

В настоящей работе было получено несколько генетических конструкций моноАТ-Ц на основе антитела против опухолевого антигена HER2 и ИФН- α -2b человека, которые отличались размером линкерной последовательности. Кроме того, методом сайт-мутagenеза в домене интерферона была проведена замена кодонов, кодирующих цистеин на кодоны, кодирующие серин.

Результаты исследования подтвердили правильность сборки методом комбинированного ИФА полноценной гибридной молекулы, и предположение о сохранении функциональной активности аффинного компонента слитного белка при взаимодействии с антигеном в ИФА.

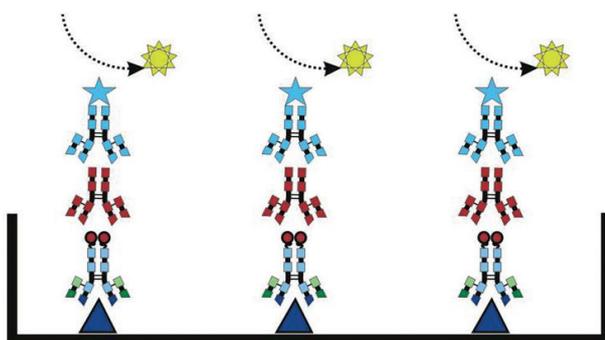


Рис. 8. Схема ИФА с использованием иммобилизованного антигена ERBB2 (синий треугольник), который взаимодействует с аффинным доменом слитного белка, полученного в данной работе. Первичные антитела (красные) – аффинны к ИФН- α , вторичные (голубые) – мечены пероксидазой. Остальные обозначения как на рис. 6

Fig. 8. ELISA using immobilized ERBB2 antigen (blue triangle), binding to the affinity domain of the fusion protein produced in this work. Primary antibodies (red) are affine for IFN- α , secondary (blue) – are labeled with peroxidase. Other designations in Fig.6

ЛИТЕРАТУРА

- McKeage K., Perry C.M. Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. Review. *Drugs*, 2002, 62(1), 209–243.
- Дорохов Ю.Л., Шешукова Е.В., Кособокова Е.Н., и др. Функциональная роль углеводных остатков в иммуноглобулине G человека и терапевтических моноклональных антителах. *Биохимия*, 2016, 81(8), 835–857.
- Gül N., van Egmond M., Antibody-Dependent Phagocytosis of Tumor Cells by Macrophages: A potent effector mechanism of monoclonal antibody therapy of cancer. *Cancer Res.*, 2015, Dec 1, 75(23), 5008–5013. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1330
- Vitale M., Cantoni C., Pietra G., et al. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. Review. *Eur. J. Immunol.*, 2014, 44(6), 1582–1592. doi: 10.1002/eji.201344272
- Asmana Ningrum R. Human interferon alpha-2b: a therapeutic protein for cancer treatment. *Scientifica*, 2014. doi: 10.1155/2014/970315

6. Hutmacher C. and Neri D. Antibody-cytokine fusion proteins: Biopharmaceuticals with immunomodulatory properties for cancer therapy. Review. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2018, Sep 7, pii: S0169-409X(18)30222-9. doi: 10.1016/j.addr.2018.09.002
7. Valedkarimi Z., Nasiri H., Aghebati-Maleki L., et al. Antibody-cytokine fusion proteins for improving efficacy and safety of cancer therapy. Review. *Biomed. Pharmacother.*, 2017, 95, 731–742. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.160
8. Huang T.H., Chintalacharuvu K.R., Morrison S.L. Targeting IFN-alpha to B cell lymphoma by a tumor-specific antibody elicits potent antitumor activities. *J. Immunol.*, 2007, 179(10), 6881–6888.
9. Xuan C., Steward K.K., Timmerman J.M., et al. Targeted delivery of interferon-alpha via fusion to anti-CD20 results in potent antitumor activity against B-cell lymphoma. *Blood*, 2010, 115(14), 2864–2871. doi: 10.1182/blood-2009-10-250555
10. Rossi E. A., Goldenberg D.M., Cardillo T.M., et al. CD20-targeted tetrameric interferon- α , a novel and potent immunocytokine for the therapy of B-cell lymphomas. *Blood*, 2009, 114(18), 3864–3871.
11. Rossi E. A., Rossi D.L., Cardillo T.M., et al. Preclinical studies on targeted delivery of multiple interferon-alpha-2b to HLA-DR in diverse hematological cancers. *Blood*, 2011, 118(7), 1877–1884.
12. Frey K., Zivanovic A., Schwager K., et al. Antibody-based targeting of interferon-alpha to the tumor neovasculature: a critical evaluation. *Integrative Biology*, 2011, 3(4), 468–478.
13. Кособокова Е.К., Пинюгина М.В., Косоруков В.С. Получение биологически активного интерферона- α -2b человека из растений *Nicotiana benthamiana*. *Биотехнология*, 2015, (4), 52–61.
14. Комарова Т.В., Косоруков В.С., Фролова О.Ю. и др. Трастузумаб растительного происхождения (герцептин) ингибирует пролиферацию HER2/Neu + клеток и замедляет рост опухоли. *PLoS One*, 2011, March 3, 6(3), 17541. doi: 10.1371
15. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Magnification—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. Review. *Vaccine*, 2005, 23(17–18), 2042–2048.
16. Lico C., Chen Q., Santi L. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. Review. *J. Cell Physiol.*, 2008, 216(2), 366–377. doi: 10.1002/jcp.21423
17. Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 2003, 33 (5), 949–956.

Development of Fusion Protein Produce Technology Based on a Humanized Monoclonal Antibody Specific to Tumor Antigen HER2 and a Recombinant Human Interferon- α -2b in *Nicotiana benthamiana*

E.N. KOSOBOKOVA^{1,*}, E.V. SHESHUKOVA², M.V. PINYUGINA¹, K.M. KONOPLINA¹, V.S. KOSORUKOV¹

¹*Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 115478 Moscow, Russia*

²*Vavilov Institute of General Genetics of Russian Academy Sciences, 119991 Moscow, Russia*

*e-mail: ekkos@mail.ru

Received October 21, 2018

Revised November 21, 2018

Accepted March 15, 2019

Fusion proteins based on a recombinant human interferon- α -2b and a humanized monoclonal antibody specific to tumor antigen HER2 have been obtained by transient expression in *Nicotiana benthamiana*. To provide an effective expression and a proper immunocytokine molecule assembly the genetic constructs optimization was performed. The expression level was shown to depend on the linker length between the cytokine and the antibody moieties in the hybrid molecule. The modification of the interferon domain sequence by replacing cysteine residues with serine showed a slight increase in the production level of the target protein. The assembly of full-size fusion protein molecules was confirmed by the qualitative method of «combined ELISA» developed by the authors. The preservation of the affine domain function in the fusion proteins was proved by the ELISA method in interaction with the antigen.

Key words: interferon- α -2b, antigen HER2, plant transient expression, recombinant fusion proteins.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-2-49-57