

ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ КЛЕТКАМИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛ И ИММУНОТОКСИНОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К β -ИЗОФОРМЕ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА 90

© 2020 г. М.А. Жмурина, В.В. Врублевская, Ю.Ю. Скарга, В.С. Петренко, В.К. Жалимов, О.С. Моренков

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: mariya100694@gmail.com

Поступила в редакцию 15.07.2020 г.

После доработки 20.07.2020 г.

Принята к публикации 24.07.2020 г.

Показано, что мышинные моноклональные антитела к Hsp90 β (β -изоформа белка теплового шока 90) специфически связываются с Hsp90 β , локализованным на поверхности опухолевых и нетрансформированных клеток. После связывания с мембрано-ассоциированным Hsp90 β антитела активно диссоциировали в культуральную среду, а также интернализировались клетками. Иммуноконъюгат на основе Hsp90 β -специфического антитела и цитотоксического агента мертанзина не обладал высокой цитотоксической активностью для опухолевых клеток *in vitro*. Введение Hsp90 β -специфических антител мышам не влияло на рост первичной опухоли эпидермоидной карциномы Льюиса, в то время как метастазирование опухоли в легкие снижалось и увеличивалась средняя продолжительность жизни мышей. Полученные результаты свидетельствуют об определенном терапевтическом потенциале антител к Hsp90 β для лечения опухолевых заболеваний.

Ключевые слова: экстраклеточный Hsp90 β , моноклональные антитела, иммунотоксины, интернализация антител клетками, эпидермоидная карцинома Льюиса, метастазирование.

DOI: 10.31857/S0006302920060113

Белок теплового шока 90 (Hsp90) является белком-шапероном и участвует в фолдинге вновь синтезированных белков, сборке мультимолекулярных комплексов, деградации белков, предотвращает агрегацию и денатурацию белков при различных видах стресса [1]. Выявлено более 200 внутриклеточных белков-клиентов Hsp90, участвующих в клетках в трансдукции сигналов, внутриклеточной сигнализации, транскрипции, регуляции экспрессии генов и т.д. [2, 3]. Существуют две изоформы Hsp90: Hsp90 α (индукбельная форма) и Hsp90 β (конститутивная форма). Уровень гомологии двух изоформ Hsp90 составляет 86%, однако имеются существенные различия в их биохимических свойствах, экспрессии и функционировании [4].

Кроме выполнения внутриклеточных функций Hsp90 обнаруживается вне клетки (экстраклеточный Hsp90 – eHsp90) в свободной форме во

внеклеточном пространстве и в форме Hsp90, ассоциированного с плазматической клеточной мембраной [5–7]. eHsp90 играет важную роль в обеспечении миграции и инвазии нормальных и опухолевых клеток, а также в процессах метастазирования опухолевых клеток [5–15]. В сравнении с нормальными клетками в опухолевых клетках существенно повышена мембранная экспрессия и секреция Hsp90, при этом уровень Hsp90 на плазматической мембране коррелирует с метастатическим потенциалом клеток [11, 16]. Показано, что поверхностно-ассоциированный Hsp90 активно интернализуется опухолевыми клетками *in vitro* и в организме животных [17].

Важная роль eHsp90 в обеспечении инвазии и метастазирования опухолевых клеток [5–15], а также выраженная экспрессия Hsp90 на мембране опухолевых клеток [11, 16] делают его перспективной молекулярной мишенью для создания противоопухолевых препаратов. Показано, что ингибирование eHsp90 с помощью специфических антител, а также с помощью непроникающих в клетку низкомолекулярных ингибиторов Hsp90 приводило к снижению миграции опухоле-

Сокращения: Hsp90 – белок теплового шока 90, eHsp90 – экстраклеточный Hsp90, ДМЕМ – среда Игла в модификации Дальбекко, ЭБС – эмбриональная бычья сыворотка, ИФА – иммуноферментный анализ, ФСБР – фосфатно-солевой буферный раствор.

вых клеток *in vitro* и ингибированию метастазирования опухолей у животных [6, 18–22]. Очевидно, что ингибиторы еHsp90, в том числе и Hsp90-специфические антитела, имеют значительный потенциал для создания на их основе противоопухолевых препаратов антиметастатического действия. Кроме этого, так как повышенная мембранная экспрессия и интернализация еHsp90 является феноменом, характерным для опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* [11, 16, 17], еHsp90 могут рассматриваться в качестве опухолеспецифических мишеней для иммунотоксических препаратов, селективно связывающихся с опухолевыми клетками и поражающих их. К настоящему времени продемонстрирована активность Hsp90 α -специфических антител в ингибировании метастазирования опухолей у мышей [20, 21]. Противоопухолевая активность антител, направленных к Hsp90 β изоформе, к настоящему времени не исследована. Также не исследован потенциал Hsp90-специфических антител для создания цитотоксических противоопухолевых препаратов. В данной работе мы показали, что иммунотоксины на основе Hsp90 β -специфических антител и мертанзина (DM1) обладают слабой цитотоксической активностью *in vitro* в отношении опухолевых клеток, что, вероятно, связано с активной диссоциацией антител с поверхности клеток и медленной интернализацией антител клетками. На модели мышшиной эпидермоидной карциномы Льюиса продемонстрирована противоопухолевая активность Hsp90 β -специфических антител в части снижения метастазирования опухоли и увеличения времени жизни мышей с привитой опухолью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы и реактивы. В работе использовали среду Игла в модификации Дальбекко (DMEM) и эмбриональную сыворотку коров (ЭБС) производства GE Healthcare (США), растворы версена и трипсина производства ООО «БиолоТ» (Санкт-Петербург), антитела к IgG мышей («Имтек», Москва), пероксидазные конъюгаты антител против IgG мышей (Biorad, США). Общелабораторная пластиковая посуда и пластиковая посуда для культивирования клеток были производства компаний Greiner и Corning (США). Все остальные химические реактивы приобретали в компании Sigma (США).

Клеточные линии. Были использованы клеточные линии фибросаркомы человека HT1080 и глиобластомы человека A-172 из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки фибробластов сирийского хомяка ВНК-21, зеленой мартышки Vero и эпидермоидной карциномы Льюиса (LLC) получали из коллекции клеточных культур ИБК РАН

(Пушино Московской обл.). Клетки выращивали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и антибиотики (по 40 Ед пенициллина, стрептомицина и гентамицина) (DMEM-ЭБС).

Очистка антител и конъюгирование с DM1. Полученные в лаборатории культур клеток и клеточной инженерии ИБК РАН мышшиные моноклональные антитела к Hsp90 (клон 1D5/A7, материалы готовятся к публикации) и контрольные антитела против gB вируса болезни Ауески (клон 34/2) [23] очищали из асцитной жидкости с помощью ионообменной хроматографии, как описано ранее [24]. Очищенные антитела 1D5/A7 и 34/2 конъюгировали с цитотоксическим соединением мертанзин (DM1) с использованием гетеробифункционального агента Sulfo-SMCC [25]. Для проведения экспериментов на клеточных культурах препараты очищенных антител и конъюгатов антител с мертанзином диализовали против большого объема среды DMEM в течение двух суток (три смены среды DMEM) и стерилизовали фильтрацией через фильтры Durapore (Millipore, США) с диаметром пор 0.22 мкм.

Оценка связывания антител с клетками, их интернализации клетками и диссоциации в культуральную среду. Для оценки связывания антител с клетками, клетки выращивали до состояния монослоя, промывали холодным фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБР), содержащим азид натрия (ФСБР-NaN₃), и инкубировали с антителами (1D5/A7 или 34/2) в концентрации 5 мкг/мл в течение 1 ч при температуре 4°C. После инкубации клетки тщательно отмывали холодным ФСБР-NaN₃, лизировали в 0.5%-м растворе тритона X-100 и определяли в лизатах содержание антител с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), как описано ниже. Для оценки диссоциации антител, связавшихся с клеточной поверхностью, клетки обрабатывали антителами (5 мкг/мл) в среде DMEM при 4°C в течение 1 ч. После тщательной отмывки холодной средой к клеткам добавляли культуральную среду DMEM-ЭБС и инкубировали при 4°C или 37°C в течение 2 ч с последующей оценкой содержания антител в культуральной среде (диссоциированные антитела) и в клеточных лизатах (клеточно-ассоциированные антитела) с помощью ИФА. Для оценки интернализации антител клетками, клетки инкубировали в течение 4 ч при 37°C в присутствии в культуральной среде антител (5 мкг/мл), отмывали и определяли количество клеточно-ассоциированных антител с помощью ИФА. Для определения количества интернализированных клетками антител мембрано-ассоциированные антитела удаляли посредством обработки раствором 0.1 М цитрата натрия (pH 3.0) в течение 2 мин при комнатной температуре с последу-

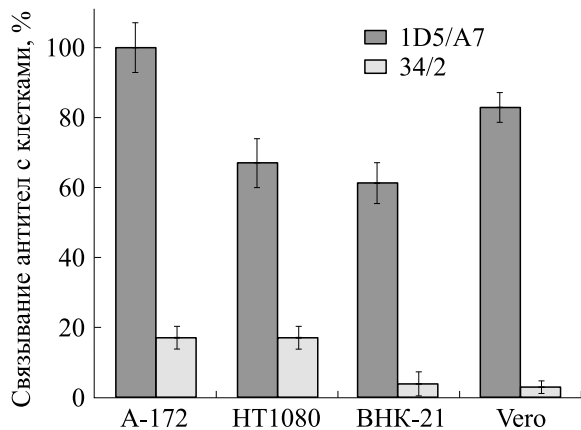


Рис. 1. Оценка связывания Hsp90 β -специфического антитела 1D5/A7 с клетками. За 100% принимали связывание антител 1D5/A7 с клетками A-172; 34/2 – негативное антитело.

ющим анализом внутриклеточных антител с помощью ИФА.

Определение содержания антител 1D5/A7 в клеточных лизатах и культуральной среде. Для определения содержания антител 1D5/A7 в лизатах клеток и культуральной среде 96-луночные планшеты сенсбилизировали аффинно-очищенными козими антителами против IgG мыши (Имтек) и блокировали неспецифическую сорбцию в ФСБР, содержащем 0.1% твин-20 и 5% сыворотки крупного рогатого скота (ФСБР-Т-КРС). Исследуемые лизаты клеток и культуральную среду титровали в ФСБР-Т-КРС и инкубировали в лунках в течение 1 ч при 37°C. Для построения калибровочной кривой использовали очищенный препарат антител 1D5/A7 с известной концентрацией. После промывки в лунки вносили пероксидазный конъюгат против IgG мыши, адсорбированный иммуноглобулинами человека, и инкубировали планшеты в течение 1 ч при 37°C. Лунки промывали, проявляли реакцию с помощью орто-фенилендиамина, определяли оптическую плотность при 490 нм (OP_{490}) и рассчитывали концентрацию антител в образцах.

Определение цитотоксичности конъюгатов антител с DM1. Стерильные диализованные препараты иммуноконъюгатов антител 1D5/A7 и 34/2 с DM1 разводили до необходимых концентраций в среде ДМЕМ-ЭБС. Определение цитотоксичности препаратов антител и иммунотоксических конъюгатов проводили на клетках A-172, HT1080, ВНК-21 и Vero с помощью МТТ-метода, как описано ранее [26]. IC_{50} рассчитывали как минимальную концентрацию иммуноконъюгата, вызывающую гибель 50% клеток за 72 ч.

Определение противоопухолевой активности препаратов антител 1D5/A7 на животных. Суспен-

зию клеток карциномы Льюиса LLC, выращенных *in vitro*, центрифугировали, разводили в среде ДМЕМ до концентрации $1 \cdot 10^7$ кл./мл и вводили сингенным мышам линии C57BL/6 (шесть-восемь недель, самки массой 18–20 г). В работе использовали мышей линии C57BL/6, полученных из Питомника животных ИБХ РАН (Пушино Московской обл.). Введение опухолевых клеток осуществляли в объеме 100 мкл ($1 \cdot 10^6$ кл./мышь) подкожно в боковую область животного. Стерильные диализованные против ФСБР антитела вводили внутрибрюшинно на протяжении 11 суток, начиная с первых суток после введения опухолевых клеток. Дозы введения антител: первая инъекция – 2 мг/мышь, последующие инъекции – 1 мг/мышь. Контрольной группе подопытных животных вводили контрольные антитела 34/2 по той же схеме. Экспериментальная и контрольная группы состояли из 15 мышей при оценке метастазирования и из 20 мышей при оценке продолжительности жизни мышей и размеров первичной опухоли. Измерения длины (Д) и ширины (Ш) опухоли проводили с помощью штангенциркуля ежедневно, начиная с девятого суток. Объем опухоли рассчитывали по формуле: $V = (1/2) \times Д \times Ш^2$. В этих же экспериментах определяли влияние антител на среднюю продолжительность жизни животных. В экспериментах по оценке метастазирования на 21-е сутки роста карциномы животным проводили цервикальную дислокацию, извлекали легкие и определяли количество окрашенных метастазов на поверхности легких.

Статистическая обработка. Каждый эксперимент проводили не менее трех раз. Каждая точка представляет собой среднее арифметическое значение повторов \pm стандартное отклонение. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-теста Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе исследовали полученные в ИБК РАН моноклональные мышинные антитела 1D5/A7, направленные к β -изоформе Hsp90 (материалы готовятся к печати). Количественную оценку связывания антитела 1D5/A7 с клеточной поверхностью проводили с помощью ИФА, определяющего содержание антител в образцах. При 4°C, в условиях блокирования процесса интернализации антител клетками, антитела 1D5/A7 эффективно и специфически связывались с клетками опухолевых линий A-172 и HT1080, а также нетрансформированных клеточных линий ВНК-21 и Vero (рис. 1).

Для оценки интернализации антител клетками в условиях постоянного присутствия антител в среде клетки инкубировали с антителами в среде

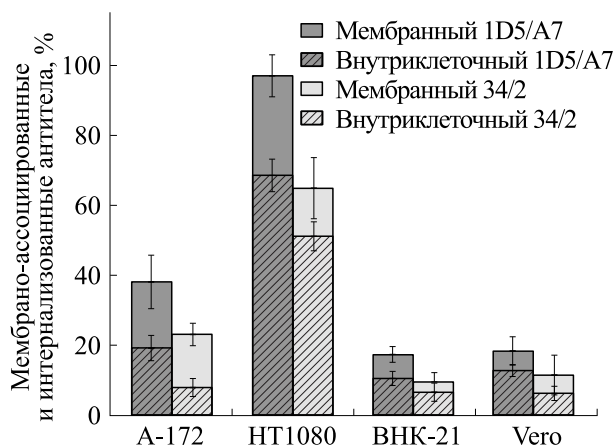


Рис. 2. Оценка интернализации антител 1D5/A7 клетками в условиях постоянного присутствия антител в культуральной среде. За 100% принимали суммарное количество антител 1D5/A7 (мембрано-ассоциированные и интернализированные антитела) в клетках HT1080.

ДМЕМ-ЭБС при 37°C в течение 4 ч, после чего оценивали количество антител, ассоциированных с клетками, включая количество интернализированных антител (обработка клеток «кислым» буферным раствором приводила к удалению с поверхности клеток антител, что позволяло дифференцировать мембрано-ассоциированные и интернализированные антитела). Результаты представлены на рис. 2. В условиях постоянного присутствия антител в среде антитела 1D5/A7 интернализировались опухолевыми клетками А-172 и HT1080, интернализация антитела неопухолевыми клетками ВНК-21 и Vero была снижена в два-четыре раза в сравнении с опухолевыми клетками. Следует отметить, что негативное антитело 34/2 также эффективно интернализировалось клетками: уровень интернализации негативного антитела был лишь в полтора раза ниже по сравнению с антителами 1D5/A7.

Для оценки диссоциации в культуральную среду мембрано-ассоциированных антител 1D5/A7 клетки инкубировали с антителами при 4°C в течение 1 ч в условиях блокирования эндоцитоза/пиноцитоза. Далее клетки промывали средой и инкубировали в среде без антител при 4°C или 37°C в течение 2 ч, оценивая количество клеточно-ассоциированных антител и антител, диссоциированных в среду с поверхности клеток. Оказалось, что за 2 ч инкубации клеток при 37°C значительная часть антител, связанных с Hsp90 β (более 80%), диссоциировала от поверхности клеток и переходила в среду (рис. 3). Диссоциация антител (комплексов антитело-Hsp90 β) в среду при инкубации при 4°C также наблюдалась, но в меньшей степени (рис. 3).

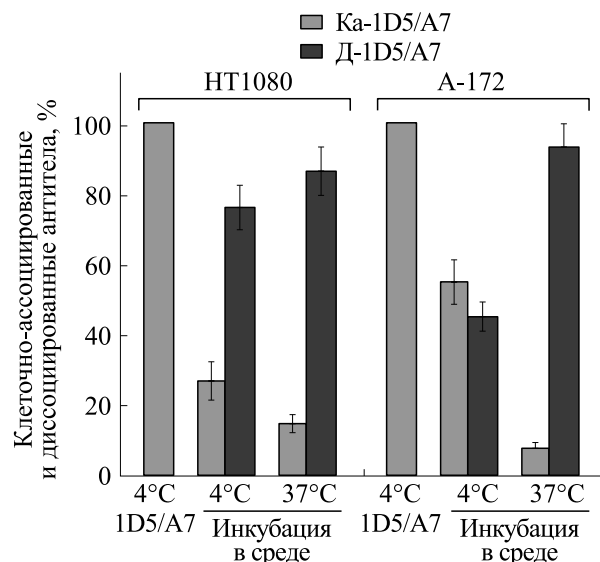


Рис. 3. Оценка диссоциации в культуральную среду антител 1D5/A7, связавшихся с поверхностью клеток. Антитела инкубировали с клетками в течение 1 ч при 4°C. После тщательной отмывки клетки инкубировали в среде в течение 2 ч при 4°C или при 37°C. Оценивали количество клеточно-ассоциированных (Ka-1D5/A7) и диссоциированных от клеточной поверхности (D-1D5/A7) антител.

Далее мы оценили потенциал Hsp90 β -специфических антител 1D5/A7 для создания иммунотоксина. Антитела конъюгировали с широко используемым токсическим агентом мертанзином (DM1). Спектры полученного конъюгата 1D5A7 представлены на рис. 4. Наличие дополнительных пиков на спектре конъюгатов с пиком поглощения 250 нм свидетельствовало о пришивке DM1 к антителу.

Полученный иммуноконъюгат 1D5/A7-DM1 взаимодействовал с нативным бычьим Hsp90 в ИФА, что свидетельствовало о сохранении активности антител в составе иммуноконъюгата. Конъюгат 1D5/A7-DM1 обладал токсичностью в отношении клеток, однако концентрация, вызывающая 50%-ю гибель клеток (IC_{50}), для опухолевых линий А-172 и HT1080 была довольно высокой и составляла 1–4 мкг/мл (рис. 5). IC_{50} для иммуноконъюгата контрольного антитела 34/2 была сопоставима с иммуноконъюгатом антитела 1D5/A7, что согласуется с данными по сопоставимой эффективности интернализации антитела 1D5/A7 и контрольного антитела 34/2. Цитотоксичность иммуноконъюгата 1D5/A7-DM1 для опухолевых клеток была в два-пять раз выше, чем для клеток нетрансформированных линий; гибель опухолевых клеток HT1080 и А-172 наблюдалась при более низких концентрациях иммуноконъюгатов, чем для клеток ВНК-21 и Vero (рис. 5).

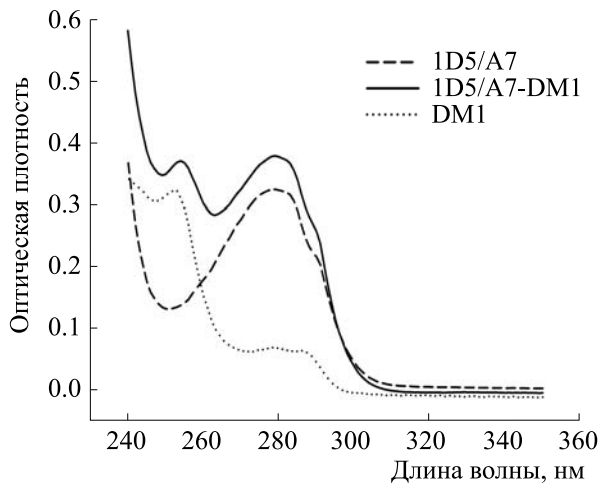


Рис. 4. Оценка пришивки мертанзина к моноклональному антителу 1D5/A7.

В целом полученные данные свидетельствовали о невысокой эффективности иммунотоксина на основе Hsp90 β -специфического антитела 1D5/A7. С учетом полученных результатов мы посчитали нецелесообразным проведение экспериментов на животных для оценки активности иммунотоксина 1D5/A7-DM1, так как необходимость поддержания высоких концентраций конъюгата неизбежно приводит к высокой общей токсичности препарата для животных.

Связывание антител с опухолевыми клетками может запускать врожденные иммунные эффекторские механизмы [27–30], приводящие к элиминации или торможению развития опухолевых клеток. С учетом этого, мы оценили влияние антитела 1D5/A7 на рост первичной опухоли, метастазирование и выживаемость мышей на модели метастазирующей эпидермоидной карциномы легких Льюиса. Введение антитела 1D5/A7 животным не влияло на процесс развития первичной опухоли, однако снижало примерно в два раза метастазирование опухоли в легкие и увеличивало на 16% среднюю продолжительность жизни животных после введения опухоли (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Hsp90 экспрессируется на мембране опухолевых клеток и играет важную роль в инвазии и метастазировании опухолевых клеток [8–13, 16]. Ингибирование eHsp90 с помощью Hsp90 α -специфических антител приводило к замедлению миграции опухолевых клеток *in vitro* и снижению метастазирования опухолей у животных [19–21], что свидетельствует о потенциале Hsp90-специфических антител в качестве противоопухолевых препаратов антиметастатического действия. В данной работе мы исследовали противоопухоле-

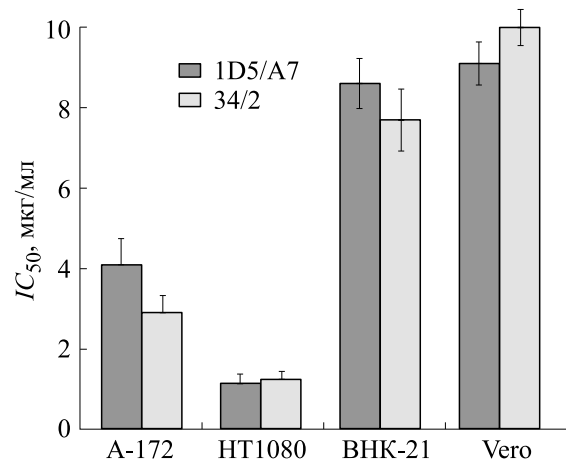


Рис. 5. Цитотоксичность иммуноконъюгата 1D5/A7-DM1 на линиях опухолевых и неопухолевых клеток.

вый потенциал Hsp90 β -специфических антител (клон 1D5/A7), полученных в ИБК РАН. При этом оценивали противоопухолевую активность 1D5/A7 как в форме очищенного антитела, так и в форме иммунотоксина.

В основе цитотоксического действия иммунотоксина лежит их специфическое связывание с поверхностью клеток и интернализация клетками, что приводит к высвобождению цитотоксина внутри клетки и их гибели. Мы обнаружили, что антитело 1D5/A7 специфически связывалось как с опухолевыми клетками A-172 и HT1080, так и с нетрансформированными клетками BHK-21 и Vero, и интернализировались клетками. При этом эффективность интернализации антител опухолевыми клетками A-172 и HT1080 была в два-четыре раза выше в сравнении с нетрансформированными клетками BHK-21 и Vero. Следует отметить, что интернализация контрольных антител 34/2, которые не связываются с клетками, была сопоставима с Hsp90 β -специфическими антителами 1D5/A7. Это свидетельствовало в пользу того, что рецептор-зависимая интернализация комплексов «антитело–Hsp90 β » клетками была медленной и незначительно превалировала над неспецифическим захватом антител клетками посредством пиноцитоза. Ранее было также продемонстрировано, что Hsp90 α -специфические антитела 4C5 после связывания с поверхностным Hsp90 практически не интернализировались клетками [21], что согласуется с нашими данными. С другой стороны, известно, что поверхностно-ассоциированный Hsp90 активно интернализуется опухолевыми клетками [17]. Возможно, что связывание антитела с поверхностно-ассоциированным Hsp90 замедляет его интернализацию. Кроме медленной интернализации Hsp90 β -специфических антител мы обнаружили, что после их

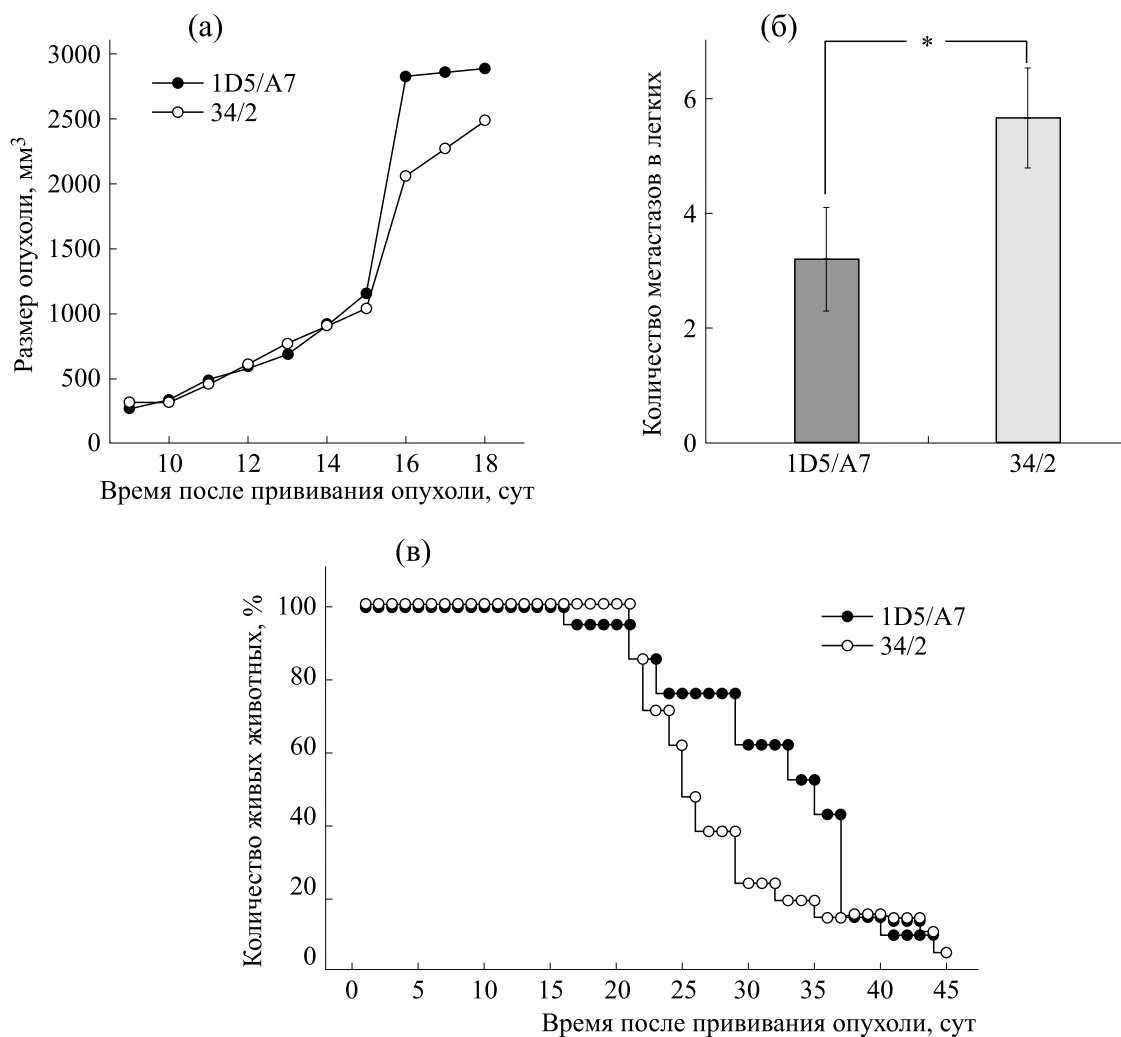


Рис. 6. Влияние введения антитела 1D5/A7 мышам с привитой карциномой Льюиса на рост первичной опухоли (а), метастазирование в легкие (б) и выживаемость животных (в); * – $p < 0.05$.

связывания с мембрано-ассоциированным Hsp90 β значительная часть антител быстро диссоциировала от поверхности клеток в культуральную среду; при этом скорость диссоциации антител значительно превышала скорость их интернализации клетками.

Для оценки возможности использовать антитело 1D5/A7 для создания иммунотоксинов антитело конъюгировали с известным токсическим агентом мертанзином (DM1). Мертанзин взаимодействует с тубулином в месте связывания ризоксина, тем самым ингибируя сборку микротрубочек, что приводит к деградации последних и нарушению митоза [31]. Мы показали, что полученный конъюгат 1D5/A7-DM1 обладал невысокой токсичностью в отношении опухолевых клеток: IC_{50} для линий А-172 и НТ1080 составляла 1–4 мкг/мл. При этом IC_{50} для иммуноконъюгата контрольного антитела 34/2 и иммуноконъюгата

антитела 1D5/A7 были сопоставимы, что согласовывалось с данными по сопоставимой эффективности интернализации антитела 1D5/A7 и контрольного антитела 34/2. В целом полученные данные свидетельствовали о невысокой эффективности иммунотоксинов на основе Hsp90 β -специфического антитела 1D5/A7: для достижения цитотоксического эффекта необходимы высокие концентрации иммуноконъюгатов, что, вероятно, связано с активной диссоциацией комплексов антител с Hsp90 β с поверхности клеток и не слишком высокой скоростью интернализации антител, связавшихся с мембрано-ассоциированным Hsp90 β . С учетом этого обстоятельства мы не исследовали иммуноконъюгат 1D5/A7-DM1 на животных, так как высокие концентрации иммуноконъюгата 1D5/A7-DM1 неизбежно приведут к высокой токсичности препарата при введении животным.

Известно, что связывание антител с белками, экспрессирующимися на поверхности опухолевых клеток, может запускать врожденные иммунные эффекторные механизмы [27–30]. Антитела класса G способны активировать антителозависимую клеточную цитотоксичность посредством связывания иммунных эффекторных клеток (NK-клетки и др.) через Fc-γ-рецепторы, расположенные на поверхности эффекторных клеток, с Fc-фрагментом опухолеспецифических антител; после связывания эффекторные клетки вызывают лизис опухолевых клеток, используя различные механизмы [32]. Ассоциированные с клетками антитела также способны активировать классический путь активации комплемента посредством связывания комплекса белков комплемента с Fc-фрагментом антитела; формирование такого комплекса приводит в конечном счете к клеточному лизису и фагоцитозу [33, 34]. С учетом вышесказанного мы провели оценку противоопухолевой активности Hsp90β-специфического антитела 1D5/A7 на модели эпидермоидной карциномы Льюиса – опухоли мышей с относительно быстрым развитием, дающей выраженные метастазы в легкие животных [35]. При многократном введении мышам антитело 1D5/A7 не влияло на процесс развития первичной опухоли, что согласуется с данными, полученными с другими экстраклеточными ингибиторами Hsp90 [6, 18–22]. С другой стороны, введение Hsp90β-специфического антитела мышам снижало метастазирование опухоли в легкие и увеличивало среднее время жизни животных. Ранее было показано, что антитела к Hsp90α-изоформе существенно ингибировали метастазирование опухолей у мышей [20, 21], что согласуется с нашими данными. Ингибирующий эффект Hsp90β-специфического антитела 1D5/A7 вероятнее всего связан с торможением миграции и инвазии опухолевых клеток, что приводит к снижению метастазирования клеток. Необходимы дальнейшие исследования антиметастатической активности Hsp90α- и Hsp90β-специфических антител на различных моделях опухолей животных и человека.

ВЫВОДЫ

Моноклональные антитела 1D5/A7, направленные к белку теплового шока Hsp90β, эффективно связывались с Hsp90β, ассоциированным с поверхностью клеток опухолевых и нетрансформированных культур. Связавшиеся с клетками антитела активно диссоциировали в культуральную среду и интернализировались клетками. Конъюгат на основе Hsp90β-специфического антитела и цитотоксического агента мертанзина не обладал высокой цитотоксической активностью. При многократном введении антитела 1D5/A7 мышам

C57BL/6 с привитой опухолью карциномы Льюиса рост первичной опухоли не замедлялся, в то время как метастазирование опухолевых клеток в легкие снижалось и увеличивалось среднее время жизни мышей. Полученные результаты свидетельствуют о терапевтическом потенциале антител, специфичных к Hsp90β, для лечения опухолевых заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Li and J. Buchner, *Biomed. J.* **36**, 106 (2013).
2. P. C. Echeverria, A. Bernthaler, P. Dupuis, et al., *PLoS One* **6**, 26044 (2011).
3. D. Picard, *Cell. Mol. Life Sci.* **59** (10), 1640 (2002).
4. A. S. Sreedhar, E. Kalmar, P. Csermely, and Y. F. Shen, *FEBS Lett.* **562**, 11 (2004).
5. W. Li, Y. Li, S. Guan, et al., *EMBO J.* **26**, 1221 (2007).
6. S. Tsutsumi, K. Beebe, and L. Neckers, *Future Oncol.* **5**, 679 (2009).
7. X. Wang, X. Song, W. Zhuo, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 21288 (2009).
8. J. S. Chen, Y. M. Hsu, C. C. Chen, et al., *J. Biol. Chem.* **285**, 25458 (2010).
9. C. F. Cheng, J. Fan, M. Fedesco, et al., *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3344 (2008).
10. U. Gopal, J. E. Bohonowych, C. Lema-Tome, et al., *PLoS One* **6**, 17649 (2011).
11. M. W. Hance, K. Dole, U. Gopal, et al., *J. Biol. Chem.* **287** (45), 37732 (2012).
12. P. Jayaprakash, H. Dong, M. Zou, et al., *J. Cell Sci.* **128**, 1475 (2015).
13. F. Tsen, A. Bhatia, K. O'Brien, et al., *Mol. Cell Biol.* **33**, 4947 (2013).
14. S. Tsutsumi, B. Scroggins, F. Koga, et al., *Oncogene* **27**, 2478 (2008).
15. D. Thuringer, A. Hammann, N. Benikhlef, et al., *J. Biol. Chem.* **286**, 3418 (2011).
16. D. Thuringer, A. Hammann, N. Benikhlef, et al., *J. Biol. Chem.* **286**, 3418 (2011).
17. B. Becker, G. Multhoff, B. Farkas, et al., *Experim. Dermatology* **13**, 27 (2004).
18. L. B. Crowe, P. F. Hughes, D. A. Alcorta, et al., *ACS Chem. Biol.* **12**, 1047 (2017).
19. B. K. Eustace, T. Sakurai, J. K. Stewart, et al., *Nat. Cell Biol.* **6**, 507 (2004).
20. K. Sidera, M. Gaitanou, D. Stellas, et al., *J. Biol. Chem.* **283**, 2031 (2008).
21. D. Stellas, A. El Hamidieh, and E. Patsavoudi, *BMC Cell Biol.* **11**, 51 (2010).
22. D. Stellas, A. Karameris, and E. Patsavoudi, *Clin. Cancer Res.* **13** (6), 1831 (2007).
23. J. McCready, D. S. Wong, J.A. Burlison, et al., *Cancers (Basel)* **6**, 1031 (2014).
24. M. M. Zaripov, O. S. Morenkov, B. Siklodi, et al., *Res. Virol.* **149**, 29 (1998).

24. M. Oppermann, in *Monoclonal antibodies*, Ed. by J. P. Peters and H. Baumgarten (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1992), pp. 271–275.
25. A. G. Polson, S.-F. Yu, K. Elkins, et al., *Blood* **110** (2), 616 (2007).
26. A. Lisov, V. Vrublevskaya, Z. Lisova, et al., *Viruses* **7** (10), 5343 (2015).
27. T. Ben-Kasus, B. Schechter, M. Sela, and Y. Yarden, *Mol. Oncol.* **1**, 42 (2007).
28. A. M. Scott, J. D. Wolchok, and L. J. Old, *Nat. Rev. Cancer* **12**, 278 (2012).
29. C. W. Shuptrine, R. Surana, and L. M. Weiner, *Semin. Cancer Biol.* **22**, 3 (2012).
30. L. M. Weiner, J. C. Murray, and C. W. Shuptrine, *Cell* **148**, 1081 (2012).
31. M. Lopus, *Cancer Lett.* **307**, (2011).
32. T. Kubota, R. Niwa, M. Satoh, et al., *Cancer Sci.* **100**, 1566 (2009).
33. J. R. Dunkelberger and W. C. Song, *Cell. Res.* **20**, 34 (2010).
34. K. A. Stoermer and T. E. Morrison, *Virology* **411**, 362 (2011).
35. J. S. Bertram and P. Janik, *Cancer Lett.* **11**, 63 (1980).

Internalization by Cells and Antitumor Activity of Antibodies and Immunotoxins Specific for Heat Shock Protein 90 Beta Isoform

M.A. Zhmurina, V.V. Vrublevskaya, Y.Y. Skarga, V.S. Petrenko, V.K. Zhalimov, and O.S. Morenkov

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

We showed that the mouse monoclonal antibodies directed against the beta isoform of heat shock protein 90 (Hsp90 β) bind specifically to Hsp90 β found on the surface of tumor and untransformed cells. After binding to membrane-associated Hsp90 β , antibodies actively dissociated into the culture medium and were internalized by cells. An immunoconjugate prepared on the basis of the Hsp90 β -specific antibody and the cytotoxic agent mertansine did not exhibit high cytotoxic activity against tumor cells in vitro. The injection of the Hsp90 β -specific antibody into mice did not influence the growth of primary tumor of epidermoid Lewis lung carcinoma but suppressed the metastasis of tumor in the lungs and increased the mean life span of mice. The results suggest a certain therapeutic potential of antibodies directed against Hsp90 β for tumor therapy.

Keywords: extracellular Hsp90 β , monoclonal antibodies, immunotoxins, internalization of antibodies by cells, epidermoid Lewis lung carcinoma, metastasis