

КОНФОРМАЦИЯ, СТАБИЛЬНОСТЬ И ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ИММУНОТОКСИНА SCFV4D5-БАРНАЗА, СПЕЦИФИЧНОГО К С-ERBB2-ЭКСПРЕССИРУЮЩИМ КЛЕТКАМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**В.В. Середа¹, А.П. Власов¹, Д.В. Шубенок¹, Д.В. Фима¹, З.И. Кравчук¹,
С.Г. Одинцов¹, С.М. Деев², С.П. Марцев¹**

*¹Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии,
Минск, Беларусь,*

*²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия*

Введение

Значительная по своей представительности группа опухолей способна к гиперэкспрессии на поверхности трансформированных клеток онкогена-маркера с-ErbB2 (иные обозначения: HER-2/neu, p185HER2), что коррелирует с агрессивностью течения, резистентностью опухоли к химиотерапии и плохим прогнозом. Маркер с-ErbB2 является частью тирозинкиназного рецепторного комплекса – структурного гомолога рецептора эпидермального фактора роста с не установленной лигандной специфичностью. К группе с потенциальной способностью к гиперэкспрессии с-ErbB2 относятся рак молочной железы, карцинома яичника, легких и некоторые другие опухоли [1]. Несмотря на то, что из общего числа больных с этой группой опухолей лишь от 25 до 40% пациентов экспрессируют с-ErbB2 [2], группа с-ErbB2-позитивных больных весьма многочисленна. Терапия в этой группе часто имеет неблагоприятный исход, что требует применения новых подходов. Одним из таких подходов является иммунотерапия на основе гуманизированного антитела к маркеру ErbB2; антитело получило коммерческое название Герцептин (международное название – Трастузумаб). Его клиническое применение (как правило, в сочетании с химиотерапией) дает увеличение уровня терапевтического ответа, предположительно через механизм комплемент-зависимой цитотоксичности [2]. Однако значительно более высокие уровни терапевтического ответа даже в схемах монотерапии ожидаются в случае применения химерных иммунотоксинов прямого действия, не требующих участия комплемента. Подобные иммунотоксины разрабатываются группой лидирующих лабораторий [1, 3-5] и представляют собой укороченные рекомбинантные антитела, конъюгированные с высокотоксичными для клетки белками растительного, бактериального или иного происхождения. В качестве фрагмента молекулы, специфически узнающего антигены-маркеры опухолевых клеток, иммунотоксины содержат вариабельные домены антител или двухдоменные scFv фрагменты (single-chain variable fragments). Последние состоят из двух антигенсвязывающих доменов (VH и VL), соединенных в одну цепь линкерным пептидом. В качестве токсического модуля иммунотоксинов используют рибосом-инактивирующие белки растений (рицин, вискумин, сапорин и другие), бактерий (экзотоксин *Pseudomonas*), грибов (флагелин), а также РНКазы животных, человека и бактерий.

Особые перспективы связаны с применением иммунотоксинов, в структуру которых входит РНКаз из бактерии *Bacillus amyloliquefaciens* – барназа. Цитотоксическое действие барназы показано на различных клетках (в том числе опухолевых), а ее применение дает ряд существенных преимуществ [5, 6], среди которых нечувствительность барназы к внутриклеточным ингибиторам РНКаз, в избытке присутствующим в организме человека [7].

В настоящей работе нами исследован рекомбинантный иммунотоксин scFv4D5-барназа, созданный на основе scFv фрагмента Герцептина (антитела 4D5) и РНКазы *Bacillus amyloliquefaciens*. В задачи исследования входило получение высокоочищенной субстанции химерного белка, изучение его фолдинга, включая особенности вторичной и третичной структуры, термодинамической и рН-стабильности в сочетании с анализом биологической активности, прежде всего способности связываться с клетками-мишенями и эффективности цитотоксического действия на линиях клеток с различным уровнем экспрессии рецептора c-ErbB2.

Материалы и методы исследования

Экспрессия и очистка рекомбинантного иммуноконъюгата scFv4D5-барназа.

Клетки *Escherichia coli*, штамм SB 536, были трансформированы стандартным методом [8] плазмидой pET23d(scFv4D5-барназа), несущей последовательность, кодирующую scFv4D5-барназу и барстар (природный цитоплазматический ингибитор барназы) [7, 9, 10]. Ночную культуру разбавляли 1:100 средой SB, содержащей ампициллин (100 мг/л) и выращивали до достижения культуральной средой оптической плотности 0,6 (на длине волны 600 нм), при 37 °С, после чего в среду добавляли индуктор изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,1 мМ и культивировали 8 ч при 27–30 °С. Затем клетки осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 20 мин, ресуспендировали в 80–100 мл 50 мМ натрий фосфатного буфера, рН 7,4, дезинтегрировали ультразвуком и центрифугировали при 35000g в течение 30 мин. Для удаления барстара цитоплазматическую фракцию наносили на колонку с Ni-NTA-сефарозой в 5 М мочевины, 50 мМ натрий фосфатный буфер, рН 7,4 и элюировали 7 М мочевины и 3 М гуанидингидрохлорида в исходном буфере.

Спектроскопия КД. Измерения были выполнены на спектрополяриметре J-20 («JASCO», Япония) в термостатируемой кювете с длиной оптического пути 1 мм в дальней (200–250 нм) и 10 мм ближней (250–300 нм) ультрафиолетовых областях соответственно. Концентрации белков составляли 0,3–0,6 мг/мл, скорость сканирования – 5 нм/мин при постоянной времени 16 с. Из белковых спектров вычитались кривые, полученные сканированием соответствующих буферов.

Флуоресцентная спектроскопия. Спектры собственной флуоресценции регистрировали при 25 °С в термостатируемой кювете с длиной оптического пути 1 см при помощи спектрофлуориметра SFL-1211 («Solar», Минск, Беларусь), оборудованного персональным компьютером. Образцы для флуоресцентных исследований, содержащие белок с концентрацией 25–50 мкг/мл, инкубировали в течение ночи при 4 °С. Спектры флуоресценции буферных растворов вычитались из спектров флуоресценции образцов. Использовались длины волн возбуждения 280 и 295 нм. Спектры флуоресценции регистрировали в диапазоне 290–390 нм (при возбуждении на 280 нм) и 305–405 нм (при возбуждении на 295 нм).

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Измерения были выполнены на дифференциальном адиабатном сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 («Биоприбор», Россия) в температурном диапазоне 10–80 °С согласно протоколу, описанному в работе [11]. Энтальпию тепловой денатурации и теплоемкость рассчитывали по соответствующему алгоритму с использованием программ TERMCALC и SCAL («Биоприбор», Россия) и DSCfit (Институт молекулярной биофизики, Флорида, США) [12, 13]. Деконволюцию профилей избыточной теплоемкости производили при помощи программы SCAL [14].

Определение РНКазной активности химерного иммунотоксина. Скорость деградации РНК измеряли спектрофотометрически по уменьшению поглощения раствора, содержавшего химерный белок scFv4D5-барназа и РНК дрожжей, по методу Кунитца [15]. Эксперименты проводились при комнатной температуре в кювете с длиной оптического пути 1 см в 0,1 М

натрий-фосфатном буфере, pH 7,4. Светопоглощение РНК измерялось на 300 нм.

Методика ИФА связывания иммунотоксина scFv4D5-барназа с клеточными линиями рака молочной железы (прямое связывание и конкурентный тест). В анализе использовали 96-луночные планшеты для иммунологических реакций (Sarstedt). 104 клеток линий BT-474 или MCF-7 наносили в лунки планшета в объеме 100 мкл в соответствующей каждой линии культуральной среде. Планшет инкубировали при 37 °С в CO₂-инкубаторе в течение ночи, и клетки фиксировали 4% раствором формальдегида в 50 mM натрий-фосфатном буфере, pH 7,4 (НФБ) для исключения их десорбции с поверхности планшета в ходе анализа. После 20 минут инкубации при комнатной температуре раствор формальдегида удаляли и промывали планшет 50 mM НФБ, pH 7,4, содержащим 0,02% твин-20 (Буфер А) 3 раза по 5 минут при легком перемешивании. Затем в лунки планшета вносили по 100 мкл раствора 0,06% перекиси водорода в 50 mM НФБ, pH 7,4, инкубировали 20 мин при комнатной температуре и промывали планшет 3 раза буфером А как указано выше. На следующей стадии в лунки вносили по 100 мкл блокирующего буфера Б, содержащего 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 0,1 M NaCl и 50 mM НФБ, pH 7,4. После 1 часа инкубации при комнатной температуре планшет промывали и для проведения прямого теста в лунки вносили по 100 мкл буфера Б, содержащего 0-6,5 мкг/мл биотинилированного иммунотоксина scFv4D5-барназа. В случае конкурентного теста в лунки вносили по 100 мкл буфера Б, содержащего 0-5 мкг/мл иммунотоксина, Герцептина или scFv4D5 фрагмента, а также 0,8 мкг/мл конкурирующего белка (scFv4D5-барназа, меченая биотином).

Планшеты инкубировали в течение 1,5–2 часов, промывали, и в лунки вносили по 100 мкл буфера Б, содержащего конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена. После 1 часа инкубации при комнатной температуре, планшет промывали и добавляли по 100 мкл субстратного буфера, содержащего 0,03% пероксида водорода и 0,1 мг/мл 3',3'-тетраметилбензидина (ТМБ) в 0,1 M цитратном буфере, pH 4,2. Реакцию проводили в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре и останавливали добавлением 50 мкл 10% серной кислоты. Учет результатов осуществляли через 5 минут на спектрофотометре с вертикальным ходом луча (ELX 800) фирмы «Biotek Instruments» при длине волны 450 нм за вычетом поглощения при 630 нм.

Определение цитотоксического действия белков на различные клеточные линии в МТТ-тесте. В лунки 96-луночных планшето́в (Sarstedt) вносили 1,5*10⁴ клеток рака молочной железы различных линий в 100 мкл соответствующей культуральной среды. Планшет инкубировали при 37 °С в CO₂-инкубаторе в течение ночи, среду удаляли и добавляли свежую среду с цитотоксическим компонентом (иммунотоксин, Герцептин, scFv4D5 фрагмент) в концентрации 0–100 мкг/мл. Клетки культивировали в течение 120 часов, культуральную среду отбирали и добавляли по 100 мкл МТТ в концентрации 5 мкг/мл. Время экспозиции с МТТ составляло 4 ч. После этого клетки ресуспандировали в лизирующем растворе, содержащем 50% 2-пропанола, 10% додецилсульфата натрия, 0,01 N соляную кислоту (объем лизирующего раствора – 100 мкл на лунку). Результаты теста учитывали на спектрофотометре при длине волны 540 нм.

Другие методы. Чистоту белков оценивали методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН), используя 5% формирующий и 12,5–17% разделительный гели с разделительной буферной системой по способу, описанному в работе [16]. Гели окрашивали красителем Кумасси бриллиантовым голубым R-250.

Концентрацию иммунотоксина определяли спектрофотометрически, используя удельный коэффициент поглощения $\epsilon = 18,6 \text{ л/(г·см)}$, рассчитанный по алгоритму, приведенному в работе [17]. Молекулярная масса белка, согласно аминокислотной последовательности, составила 42 120 Да.

Результаты и их обсуждение

Экспрессия и очистка scFv4D5-барназы. Плазмида, кодирующая синтез scFv4D5-барназы, сконструирована в совместной работе лаборатории молекулярной иммунологии Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и Университета Цюриха [5]. В составе плазмиды pET23d(scFv4D5-барназа) под контролем промотора *lac*, индуцируемого ИПТГ, содержится последовательность, кодирующая двухдоменный scFv фрагмент антитела 4D5, шарнирный участок (H), барназу, спейсерный пептид (S), пентагистидиновый тэг и барстар (рис. 1).

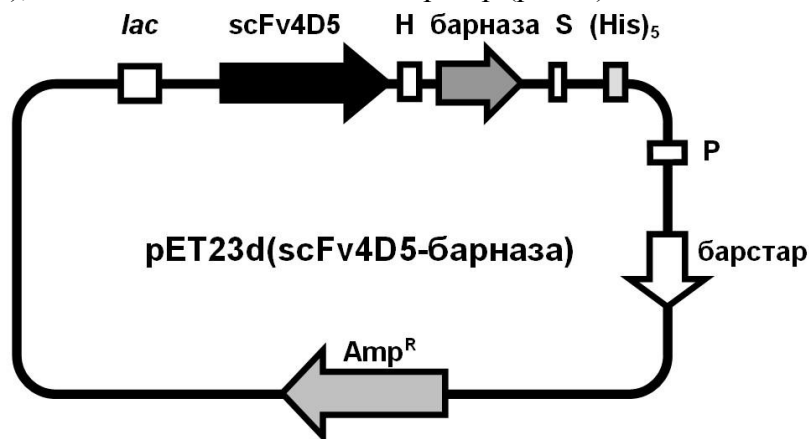


Рисунок 1 – Схема плазмиды pET23d(scFv4D5-барназа)

После очистки экспрессированного иммунотоксина металл-хелатной хроматографией степень чистоты белка по данным ДСН-ПААГ-электрофореза была не менее 95%, а выход составлял приблизительно 10-15 мг из 1 л культуры.

Спектроскопический анализ вторичной и третичной структуры рекомбинантного иммунотоксина. Спектр КД химерного белка в дальней ультрафиолетовой области содержал два пика отрицательной эллиптичности с максимумами при длинах волн 217 и 230 нм (не показано), что соответствует β -складчатой структуре scFv фрагмента и преимущественно β -складчатой структуре барназы [18]. Денатурация иммунотоксина в 8 М мочеvine вызывает радикальное изменение формы спектра с потерей дихроизма, что свидетельствует об упорядоченной вторичной структуре белка при физиологических условиях.

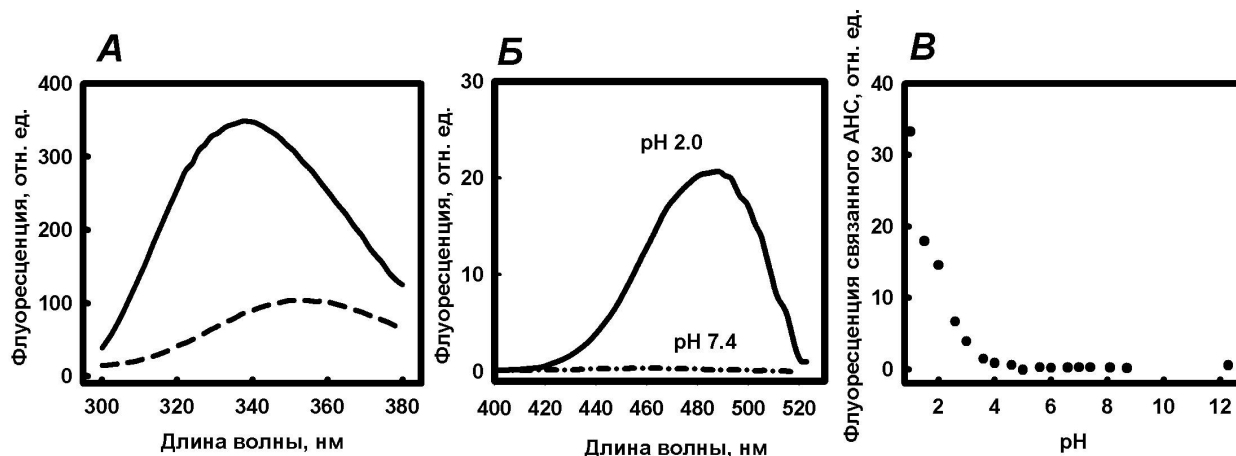


Рисунок 2 – Спектроскопическое исследование рекомбинантного иммунотоксина scFv4D5-барпаза. А – спектры собственной флуоресценции (сплошная линия – нативный белок, пунктир – денатурированное состояние); Б – спектры флуоресценции АНС в комплексе с scFv4D5-барпазой при рН 7,4 и рН 2,0; В – флуоресценция связанного зонда АНС при различных рН

Спектр собственной флуоресценции (рис. 2, А) scFv4D5-барпазы с максимумом эмиссии при 338 нм является характерным для компактных белков со сформированной третичной структурой, в которой основные флуорофоры – остатки тирозина и триптофана – вовлечены в гидрофобное ядро и защищены от тушения растворителем. Компактность третичной структуры подтверждается изменением спектра при разворачивании белка в 8 М мочеvine со снижением интенсивности флуоресценции и сдвигом максимума эмиссии с 338 нм до 351 нм вследствие экспонирования основных флуорофоров растворителю [19].

Поскольку взаимодействие иммунотоксинов с клетками-мишенями приводит к интернализации с последующим снижением рН в эндосоме, нами была исследована рН-стабильность scFv4D5-барпазы. Показано, что при снижении рН до 2 и ниже происходит уменьшение интенсивности флуоресценции наряду с длинноволновым сдвигом максимума эмиссии (данные не приведены) вследствие частичного экспонирования триптофанилов растворителю, что отражает частичную потерю третичных взаимодействий. С помощью гидрофобного зонда АНС (1-анилин-8-нафталинсульфонат) установлено, что связывание зонда вследствие потери части третичных взаимодействий и экспонирования гидрофобных кластеров начинается при значениях рН ниже 3 (рис. 2, Б, В). Это свидетельствует о достаточной рН-стабильности исследуемой рекомбинантной конструкции.

Конформация и стабильность scFv4D5-барпазы по данным дифференциальной сканирующей калориметрии. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) является наиболее информативным подходом к изучению фолдинга и конформации белков в растворе. В настоящей работе метод ДСК впервые применен для анализа третичной структуры и стабильности нового класса белков – химерных иммунотоксинов на примере белка scFv4D5-барпаза.

Кривая теплопоглощения scFv4D5-барпазы при рН 7,4 имеет бимодальный характер с двумя выраженными максимумами теплоемкости при 52 и 65 °С (рис. 3, А). Интегральная

калориметрическая энтальпия (Δh) термоденатурации химерного белка составляет 4,7 кал/г, а удельная теплоемкость (C_p) 63 кДж/(К·моль) при 25 °С. Энтальпии низко- и высокотемпературного переходов составляют соответственно 9,5 и 2,4 кал/г. Полученные величины характерны для белков со сформированной третичной структурой. Повторные прогревы показали, что обратимость тепловых переходов, изначально низкая при рН 7,4, возрастает при снижении рН (данные не приведены).

Для соотнесения двух температурных переходов на термограмме scFv4D5-барназы был использован ингибитор барназы гуанозин-3'-монофосфат (3'ГМФ), который приводит к увеличению ее термостабильности [20]. Добавление 3'ГМФ к образцу иммунотоксина достоверно увеличивало температуру первого теплового перехода на 2 °С без изменения параметров второго пика (рис. 3, Б).

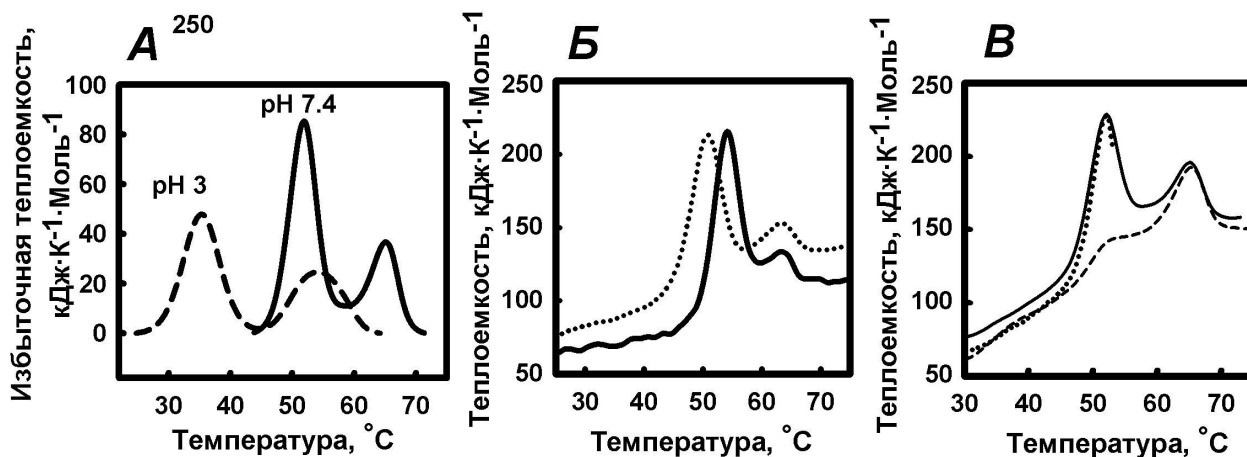


Рисунок 3 – Калориметрический анализ scFv4D5-барназы. А – температурная зависимость избыточной теплоемкости scFv-барназы; Б – эффект стабилизации барназного модуля scFv-барназы при добавлении 3'ГМФ (точечная линия – без 3'ГМФ, сплошная линия – в присутствии 2 мМ 3'ГМФ); В – Независимая термоденатурация барназного модуля в составе scFv4D5-барназы (точечная линия – предварительный прогрев до 52 °С с последующим охлаждением, пунктир – повторное сканирование, сплошная линия – кривая плавления scFv4D5-барназы без предварительного прогрева)

Это позволяет отнести низкотемпературный пик к РНКазному модулю белка, а второй тепловой переход – к плавлению scFv фрагмента. Впервые полученное нами полное разрешение пиков теплопоглощения двух структурных модулей иммунотоксина открывает уникальную возможность раздельного анализа конформации и стабильности каждого из модулей химерного белка методом ДСК, что делает сканирующую калориметрию критически важным инструментом при конструировании новых иммунотоксинов.

Бимодальный характер кривых теплопоглощения scFv4D5-барназы сохранялся при снижении рН, однако оба пика смещались в область низких температур и при рН 3,0 имели максимумы при 35 и 54 °С, соответственно (рис. 3, А); при этом процесс термоденатурации приобретал обратимый характер. Сохранение кооперативных тепловых переходов при рН 3 дополнительно свидетельствует о достаточной рН-стабильности иммунотоксина, необходимой для его интернализации и транслокации к месту действия в клетках-мишенях.

Структурная независимость узнающего и токсического модулей scFv-барназы показана нами методом сканирующей калориметрии, используя необратимость тепловых переходов при рН 7,4. Предварительный прогрев белка в ячейке калориметра до 52 °С с последующим охлаждением и повторным сканированием приводил к исчезновению низкотемпературного пика плавления барназного модуля без изменения пика scFv фрагмента

(рис. 3, В). Это доказывает структурную независимость двух модулей иммунотоксина, которая в свою очередь создает основу для функциональной независимости, то есть сохранения обеих функций химерного белка, что является критически важным условием цитотоксической активности иммунотоксина.

РНКазная активность scFv4D5-барназы была оценена по скорости деградации РНК в расчете на моль барназы [15] и составила $21,7 \text{ г с}^{-1} \text{ моль}^{-1}$, что сопоставимо со скоростью расщепления РНК изолированной барназой ($19,1 \text{ г с}^{-1} \text{ моль}^{-1}$) [7]. Таким образом, генно-инженерное слияние двух гетерологичных белков из удаленных таксономических групп – мыши (фрагмент иммуноглобулина) и бактерий (барназа) – не влияет на РНКазную активность фермента в составе химерной конструкции.

Связывание иммунотоксина с c-ErbB2 на поверхности опухолевых клеток. Сравнительный анализ связывания иммунотоксина с линиями клеток рака молочной железы с низким (MDA-MB-231, MCF-7, Hs578T) и высоким (BT-474) уровнем экспрессии рецептора c-ErbB2 проведен иммуноферментным методом с использованием биотинилированного иммунотоксина. Насыщаемый гиперболический характер кривой наблюдался только для высокоэкспрессирующей линии BT-474 (рис. 4, А), что свидетельствует о высокой специфичности иммунотоксина и является одним из необходимых условий для использования его цитотоксического действия *in vivo*.

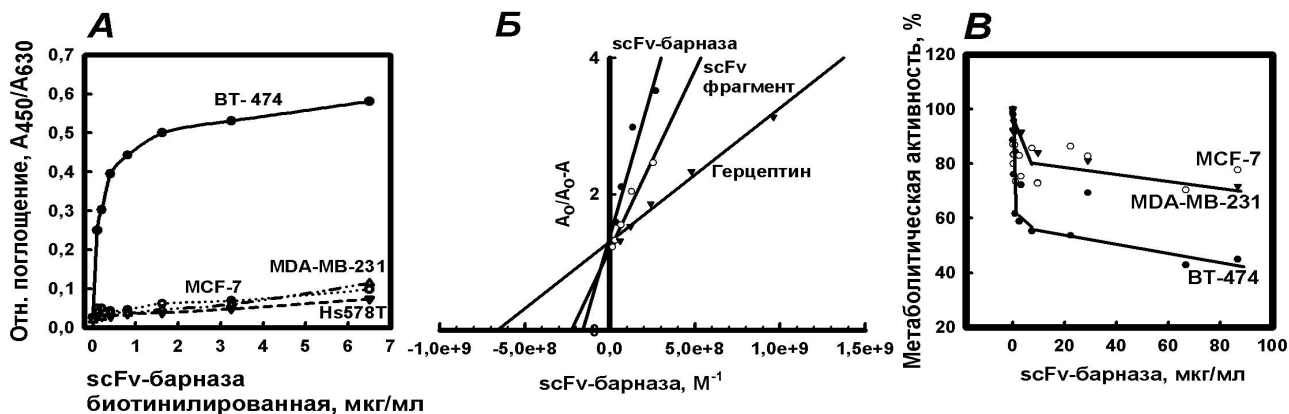


Рисунок 4 А – Кривые связывания scFv-барназы в прямом ИФА с клетками рака молочной железы BT-474 (высокий уровень экспрессии c-ErbB2), HS578T, MDA-MB-231 и MCF-7 (низкий уровень экспрессии c-ErbB2); Б – Конкурентный ИФА связывания scFv-барназы и его структурных аналогов с клетками рака молочной железы BT474: определение констант взаимодействия в координатах двойных обратных величин; В – Цитотоксическое действие scFv-барназы на клетки рака молочной железы различных линий

Константы взаимодействия конструкций на основе антитела 4D5 с рецептором c-ErbB2 определены в конкурентном ИФА, где за связывание биотинилированной scFv-барназы с клетками BT-474 конкурировали молекулы немодифицированной scFv-барназы, герцептина или же scFv фрагмента в возрастающих концентрациях (рис. 4, Б). Константы связывания (K_a) составили: для scFv-барназы – $1,7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, для изолированного scFv фрагмента – $2,4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, для герцептина – $6,7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$. Константы связывания герцептина и иммунотоксина, отличающиеся ~ в 4 раза, после коррекции на бивалентность герцептина указывают на незначительное (всего в 2 раза) преимущество полноразмерного антитела в эффективности связывания антигена-мишени. Близкие величины K_a для scFv фрагмента и иммунотоксина в совокупности с близкими величинами РНКазной активности изолированной барназы и химерного белка свидетельствуют о функциональной

независимости двух структурных модулей иммунотоксина, в полном соответствии с данными сканирующей калориметрии.

Цитотоксическая активность scFv-барназы. Начальный этап доклинических исследований потенциальных иммунотоксинов состоит в анализе их цитотоксичности в культуре клеток опухоли. Мы оценили цитотоксическое действие scFv-барназы по остаточной метаболической активности клеток рака молочной железы в МТТ-тесте после инкубации с различными концентрациями иммунотоксина. В основе теста лежит метаболическая реакция превращения растворимого 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромида (МТТ) в нерастворимый формазан митохондриальными дегидрогеназами живых клеток. Перевод формазана в растворимую форму в детергенте придает раствору пурпурный цвет, интенсивность которого пропорциональна числу жизнеспособных клеток. Инкубация рекомбинантного иммунотоксина scFv-барназа с клетками ВТ-474 в течение 5 суток приводит к выраженному цитотоксическому эффекту с гибелью до 60% клеток (рис. 4, В). Цитотоксический эффект иммунотоксина в отношении с-ErbB2-негативных клеточных линий (MDA-MB-231 и MCF-7) был весьма ограниченным: выживаемость клеток в течение пяти суток составляла более 80%, что подтверждает высокую специфичность (избирательность действия) химерной конструкции.

Заключение

Впервые проведен конформационный анализ представителя нового класса рекомбинантных белков – химерного иммунотоксина 4D5 scFv-барназа, сконструированного на основе бактериальной РНКазы и терапевтического антитела 4D5 (герцептина), специфичного к онкогену с-ErbB2, гиперэкспрессированному на клетках рака молочной железы и яичника. Методами сканирующей калориметрии, флуоресцентной и КД спектроскопии показано, что химерный белок обладает корректной вторичной и компактной третичной структурой, стабилизированной в диапазоне pH 3–7, что свидетельствует о pH-стабильности белка и об отсутствии конформационных дефектов в результате объединения двух гетерологичных структур в единую химерную конструкцию. Иммунотоксин сохраняет функциональную активность обоих структурных модулей – антиген-узнающего и РНКазного, благодаря чему способен связывается *in vitro* с клетками рака молочной железы без потери аффинности и специфичности исходного антитела 4D5 и эффективно элиминировать клетки с гиперэкспрессией с-ErbB2. Данные свидетельствуют о перспективности scFv4D5-барназы как нового потенциального агента для иммунотерапии с-ErbB2- экспрессирующих опухолей.

Исследование выполнено в рамках Государственной программы «Современные технологии в медицине» (проект № 03/06-ФИ).

Литература

1. A new human anti-tumor immunoreagent specific for ErbB2 / C. De Lorenzo [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2002. – Vol. 8. – P. 1710–1719.
2. Моисеенко, В.М. Возможности моноклональных антител в лечении злокачественных опухолей / В.М. Моисеенко // Практическая онкология. – 2002. – Т. 3, № 4. – С. 253–261.
3. Kreitman, R. J. Chimeric fusion proteins-Pseudomonas exotoxin-based / R. J. Kreitman // Curr. Opin. Investig. Drugs. – 2001. – Vol. 2. – P. 1282–93.
4. Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia / R. J. Kreitman [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2001. – Vol. 345, № 4. – P. 241–247.

5. Design of multivalent complexes using the barnase-barstar module / S.M. Deyev [et al.] // *Nature Biotechnol.* – 2003. – Vol. 21. – P. 1486–1492.
6. Fusion of the antiferritin antibody VL domain to barnase results in enhanced solubility and altered pH stability / S.P. Martsev [et al.] // *Protein Engin. Design Select.* – 2004. – Vol. 17. – P. 85–93.
7. Hartley, R.W. Barnase and barstar / R.W. Hartley // *Methods Enzymol.* – 2001. – Vol. 341. – P. 599–611.
8. Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* / T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. – 783 p.
9. Prior, T.I. Studies on the activity of barnase toxins in vitro and in vivo / T.I. Prior, S. Kunwar, I. Pastan // *Bioconjug. Chem.* – 1996. – Vol. 7. – №. 1. – P. 23–29.
10. Ribonuclease-charged vector for facile direct cloning with positive selection / S.M. Deyev // *Mol. Gen. Genet.* – 1998. – Vol. 259, № 4. – P. 379–382.
11. Tsybovsky, Y.I. Independent folding and conformational changes of the barnase module in the VL-barnase immunofusion: calorimetric evidence / Y.I. Tsybovsky, A.A. Kedrov, S.P. Martsev // *FEBS Lett.* – 2004. – Vol. 557. – P. 248–252.
12. Privalov, P.L. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein: a calorimetric study / P.L. Privalov, N.N. Khechinashvili // *J. Mol. Biol.* – 1974. – Vol. 86. – P. 665–684.
13. Grek, S.B. An efficient, flexible model program for the analysis of differential scanning calorimetry protein denaturation data / S.B. Grek, J.K. Davis, M. Blaber // *Prot. And Pept. Lett.* – 2001. – Vol. 6. – P. 429–436.
14. Freire, E. Statistical mechanical deconvolution of thermal transition in macromolecules. I. Theory and application to homogeneous systems / E. Freire, R.L. Biltonen // *Biopolymers* – 1978. – Vol. 17. – P. 463–479.
15. Kunitz, M. A spectrophotometric method for the measurement of ribonuclease activity / M.A. Kunitz // *J. Biol. Chem.* – 1946. – Vol. 164. – P. 563–568.
16. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
17. Gill, S.C. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data / S.C. Gill, P.H. von Hippel // *Analyt. Biochem.* – 1989. – Vol. 182. – P. 319–326.
18. Buckle, A.M. Protein-protein recognition: crystal structural analysis of a barnase-barstar complex at 2.0-Å resolution / A.M. Buckle, G. Schreiber, A.R. Fersht // *Biochemistry.* – 1994. – Vol. 33. – P. 8878–8889.
19. Antiferritin single-chain Fv fragment is a functional protein with properties of a partially folded state: comparison with the completely folded VL domain / S.P. Martsev // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39. – P. 8047–8057.
20. A calorimetric study of the thermal stability of barnase and its interaction with 3'GMP / J.C. Martinez // *Biochemistry.* – 1994. – Vol. 33. – P. 3919–3926.

**CONFORMATION, STABILITY AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF
RECOMBINANT IMMUNOTOXIN SCFV4D5–BARNASE DIRECTED AGAINST
C-ERBB2-EXPRESSING BREAST CANCER CELLS**

**V.V. Sereda¹, A.P. Vlasov¹, D.V. Shubenok¹, D.V. Fima¹, Z.I. Kravchuk¹,
S.G. Odintsov¹, S.M. Deyev², S.P. Martsev¹**

¹*Research and Production Center for Hematology and Transfusiology,
Minsk, Belarus,*

²*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences
Moscow, Russia*

This work provides the structural and functional study of c-ErbB2-targeted recombinant immunotoxin scFv4D5-barnase. The protein was demonstrated to possess well-defined secondary and compact tertiary structure in the pH range 3-7. The differential scanning calorimetry reveals clear-cut separation of the two thermal transitions that belong to the barnase and antigen recognition modules, that allows to separately characterize folding and stability of the two structural modules in solid thermodynamic terms. The functional activities of the antigen-binding and toxic modules remain unaltered by their fusion into a single chimeric construct. The recombinant immunotoxin scFv4D5-barnase is capable of efficiently binding to the c-erbB2-expressing cells and exerting the clearly seen cytotoxic effect toward the BT-474 cells that overexpress c-ErbB2.