

Примечание: ТАМ – активирующие опухоль макрофаги; САФ – опухоль-ассоциированные фибробласты.

Рисунок 2 – Опухолевые внеклеточные везикулы влияют на микроокружение, способствуя прогрессированию опухоли [2]

Заключение. Внеклеточные везикулы являются важными биоактивными транспортными средствами, которые используют опухолевые клетки для превращения их среды в микроокружение, поддерживающее их рост и выживание, одновременно ингибируя иммунную систему и нормальный гемопоэз. Опухолевые внеклеточные везикулы и их биологический смысл предоставляют уникальную информацию о патологическом заболевании, которое может быть использовано не только для диагностических или прогностических целей, но также для разработки новых методов лечения. Использование внеклеточных везикул в терапии хорошо переносится и дает существенные результаты. Дальнейшие исследования внеклеточных везикул в качестве биомаркеров и терапевтических моделей могут способствовать развитию более эффективных параметров таргетной терапии и лучшему пониманию того, как развивается резистентность к химиотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer / F. Urabe [и др.] // Am. J. Physiol.-Cell Physiol. – 2020. – Т. 318, № 1. – С. C29–C39.
2. O’Loghlen, A. Role for extracellular vesicles in the tumour microenvironment / A. O’Loghlen // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2018. – Vol. 373, № 1737 – P. 20160488.
3. The new deal: a potential role for secreted vesicles in innate immunity and tumor progression / A. Benito-Martin [и др.] // Front. Immunol. – 2015. – Т. 6 – С. 66.
4. Robbins, P.D. Regulation of Immune Responses by Extracellular Vesicles / P.D. Robbins, A.E. Morelli // Nat Rev Immunol. – 2014. – Vol. 14, № 3 – P. 195–208.
5. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: The Next Generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // Cell. – 2011. – Vol. 144, № 5 – P. 646–674

ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕПОЛНОРАЗМЕРНЫХ АНТИЛЕКТРОННЫХ ФРАГМЕНТОВ К ФЕРРИТИНУ IMMUNOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF FRAGMENTS OF ANTIBODIES TO FERRITIN

Б. А. Музыченко^{1,2}, Я. И. Мельникова^{1,2}

B. Muzychko^{1,2}, Ya. Melnikova^{1,2}

¹Белорусский государственный университет, БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

kaf_immunal@iseu.by, Bogdanich1313@gmail.com

¹Belarusian State University, BSU, Minsk, Republic of Belarus

²International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

В данном исследовании проанализированы антигенсвязывающие свойства ряда scFv фрагментов моно-клонального антитела HSF 102, что может использоваться при оптимизации протоколов создания рекомбинантных моноклональных антител и их фрагментов с различной длиной линкерного пептида.

In this study, the antigen-binding properties of several scFv fragments of the HSF 102 monoclonal antibody were analyzed, which can be used to optimize protocols for creating recombinant monoclonal antibodies and their fragments with different linker peptide lengths.

Ключевые слова: моноклональные антитела, scFv, ферритин.

Keywords: monoclonal antibodies, scFv, ferritin.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2022-2-128-131>

Введение. В последнее время активно развиваются инновационные технологии по созданию рекомбинантных белков, в частности антител, получаемых с помощью молекулярно-биологических манипуляций. Наиболее востребован антитела, применяемые в онкологии, а также при лечении иммунных заболеваний и трансплантации органов [2].

Благодаря разработке гибридомной технологии, стало возможно получение моноклональных антител (моно-АТ), разнообразных по строению, свойствам и специфичности. Первоначальные мышиные антитела имели существенные недостатки из-за их высокой иммуногенности и неспособности выполнять эффекторные функции в организме человека. Эти недостатки были устранены с созданием рекомбинантных “химерных”, а затем полностью “гуманизированных” антител [1].

Благодаря ряду преимуществ, которыми обладают рекомбинантные антитела и их фрагменты, сфера их возможного применения значительно шире, чем у моноклональных антител, причем в первую очередь – из-за возможности их использования в качестве терапевтических агентов при лечении различных заболеваний.

Методы генной инженерии позволяют преодолевать такие свойства моноклональных антител, затрудняющие применение в клинической практике, как, например, повышенная иммуногенность. Для дальнейшего понижения иммуногенности получают гуманизированные (почти полностью «замещенные») антитела, в которых от антител мыши остаются только участки вариабельных доменов, непосредственно взаимодействующие с антигеном, а все остальные части молекулы замещаются на последовательность человеческих иммуноглобулинов [3].

Кроме этого, генно-инженерные технологии позволяют создавать антитела к тем антигенам, которые не обладают иммуногенностью или токсичны для животных, и которые поэтому сложно получить, используя гибридомную технологию.

Одним из наиболее перспективных направлений развития технологии получения рекомбинантных антител является получение антител, обладающих более высокой аффинностью, чем исходные природные антитела.

Цель исследования – провести анализ антигенсвязывающих свойств ряда scFv фрагментов моноклонального антитела HSF 102 с различной длиной линкерного пептида.

Материалы и методы. Для получения мАТ мышей линии BALB/c иммунизировали путем многократного введения ферритина, выделенного из селезенки человека, внутрибрюшинно в полном адьюванте Фрейнда, по 100 мкг на 1 инъекцию с интервалом в 14 дней. Контроль за ходом иммунизации осуществляли путем отбора крови мышей и детекции мАТ к ферритину с помощью иммобилизованного ферритина и пероксидазного коньюгата поликлональных антител кролика к иммуноглобулинам мыши. За 3-4 дня до гибридизации мышей иммунизировали внутривенно 100 мкг белка в физиологическом растворе.

Гибридизацию спленоцитов с миеломными клетками Р3х63Ag8.6.5.3. проводили, используя 40%-ный раствор ПЭГ (M=4000 Да), содержащий 10%-ный диметилсульфоксид. Соотношение спленоцитов и миеломных клеток составляло 5:1. Затем переносили в селективную среду, содержащую гипоксантин, аминоптерин, тимидин.

После появления клонов (через 10–14 дней) отбирали культуральную жидкость из лунок с растущими клонами и тестировали на наличие мАТ к ферритину с помощью двухцентрового иммуноферментного анализа, в котором ферритин был связан с очищенными аффинной хроматографией поликлональными АТ кролика, иммобилизованными в лунках полистирольного планшета.

Проявление комплексов АГ с АТ проводили с помощью коньюгата АТ кролика к Ig мыши с пероксидазой хрена (анти-IgG-ПХ).

Отобранные культуры подвергали двухкратному клонированию методом лимитирующих разведений для получения стабильных клонов и затем использовали для препаративного выделения мАТ в виде асцитной жидкости.

Изотипы тяжелых цепей определяли с помощью иммуноферментного анализа в системе, содержащей адсорбированный в лунках полистирольных планшетов ферритин, исследуемые мАТ и пероксидазные коньюгаты поликлональных антител кролика к изотипам тяжелых цепей IgG мыши.

Антигенсвязывающую активность scFv фрагментов антител оценивали в конкурентном иммуноферментном анализе с использованием коньюгатов моноклонального антитела HSF102 с биотином.

Конкурентный тест для моноклональных антител выполняли в системе, включающей ферритин, иммобилизованный в лунках полистирольного планшета, 300 нг меченого биотином полноразмерного моноклонального антитела HSF102 и возрастающие количества конкурирующего нативного моноклонального антитела HSF102 или

укороченного фрагмента антитела в объеме 0,2 мл 0,05 М Na-фосфата pH 7,4, содержащего 1% БСА и 0,2 М NaCl. Через 1,5 ч лунки промывали и добавляли конъюгат - стрептавидина с пероксидазой хрена в разведении 1: 1000.

Определяли концентрацию антител Co5, обеспечивающую полумаксимальное связывание меченого компонента с иммобилизованным ферритином.

Результаты. Как видно из представленных результатов конкурентного теста (Рисунок 1), концентрация полумаксимального ингибиования scFv фрагментов моноAT HSF102-21.11 в 6 раз меньше аналогичного параметра полноразмерных антител, что свидетельствует о повышенной способности scFv фрагмента моноAT HSF102- связывать ферритин. Перевод полученных экспериментальных данных в координаты двойных обратных величин (Рисунок 2), позволил получить значения констант взаимодействия моноAT HSF102 и scFv-HSF102-21.11.

Рассчитанные значения констант моноAT HSF102 и scFv-HSF102-21.11 составили $0,75 \times 10^{-9}$ М и $0,5 \times 10^{-9}$ М соответственно.

Конкурентные эксперименты с использованием scFv-HSF102-21.14 (Рисунок 3А) показали, что концентрация полумаксимального ингибиования для scFv фрагмента моноAT HSF102 в 1,5 раз меньше таковой для полноразмерного моноAT HSF 102.

Представление экспериментальных данных в координатах двойных обратных величин (Рисунок 3Б), позволило определить значения констант взаимодействия, которые составили для моноAT HSF102 и scFv-HSF102-21.11 $1,4 \times 10^{-9}$ М и $1,1 \times 10^{-9}$ М соответственно.

При использовании в конкурентных экспериментах по определению степени сродства к ферритину модифицированных scFv фрагментов scFv-HSF102-21.19 (Рисунок 4А) было установлено, что концентрация полумаксимального ингибиования scFv-HSF102-21.19 в 2,5 раза меньше, чем аналогичный параметр полноразмерных антител.

Полученные данные указывают на более высокую антигенсвязывающую активность конструкта scFv-HSF102-21.19 с ферритином, по сравнению с моноклональным антителом HSF102.

Трансформация полученных экспериментальных данных в графическую систему двойных обратных величин, позволила получить значения констант взаимодействия для моноAT HSF102 и scFv-HSF102-21.19 $1,4 \times 10^{-9}$ М и $1,0 \times 10^{-9}$ М соответственно (рисунок 4Б).

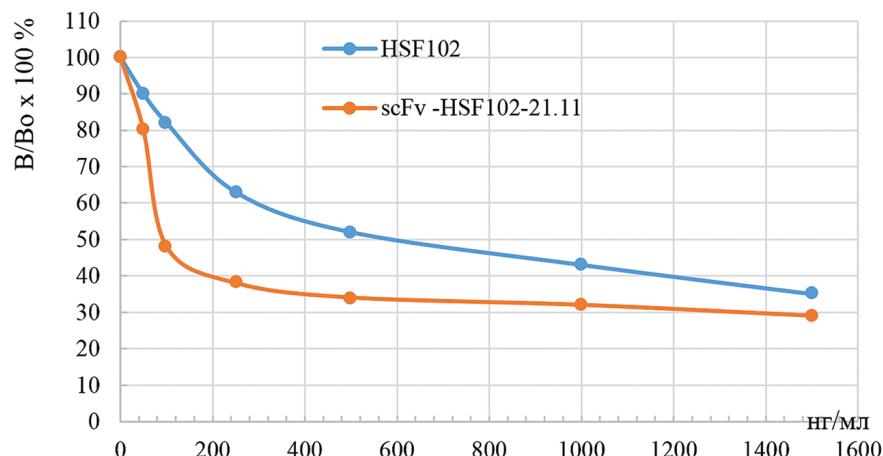


Рисунок 1 – Определение параметров связывания ферритина полноразмерных моноAT HSF102 и scFv-HSF102-21.11

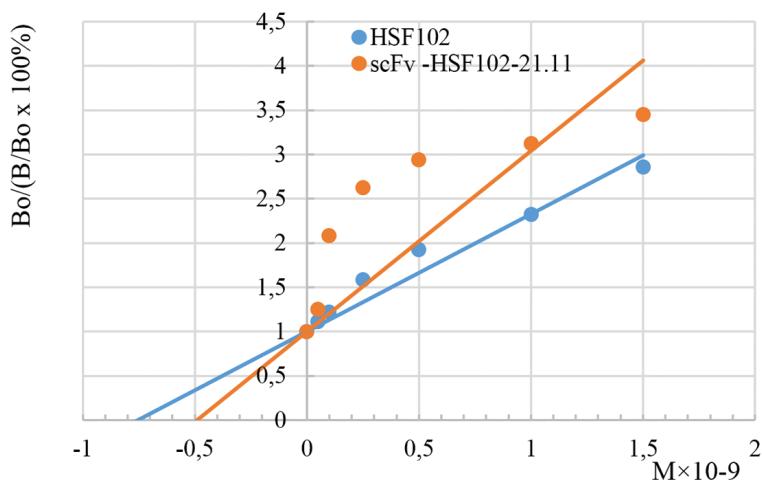


Рисунок 2 – Определение констант взаимодействия полноразмерных моноAT HSF102 и scFv-HSF102-21.11 методом двойных обратных величин

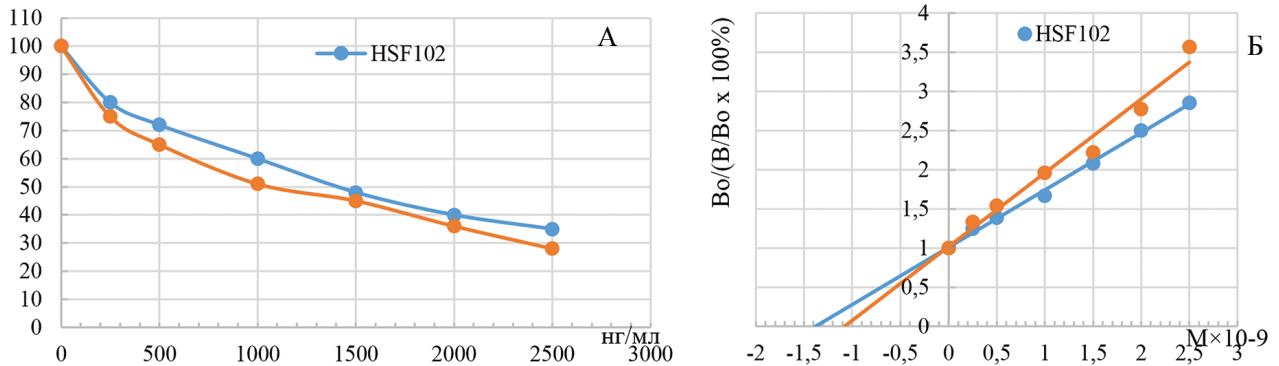


Рисунок 3 – А) Определение параметров связывания ферритина полноразмерных моноАт HSF102 и scFv-HSF102-21.14. Б) Определение констант взаимодействия полноразмерных моноАт HSF102 и scFv-HSF102-21.14 методом двойных обратных величин

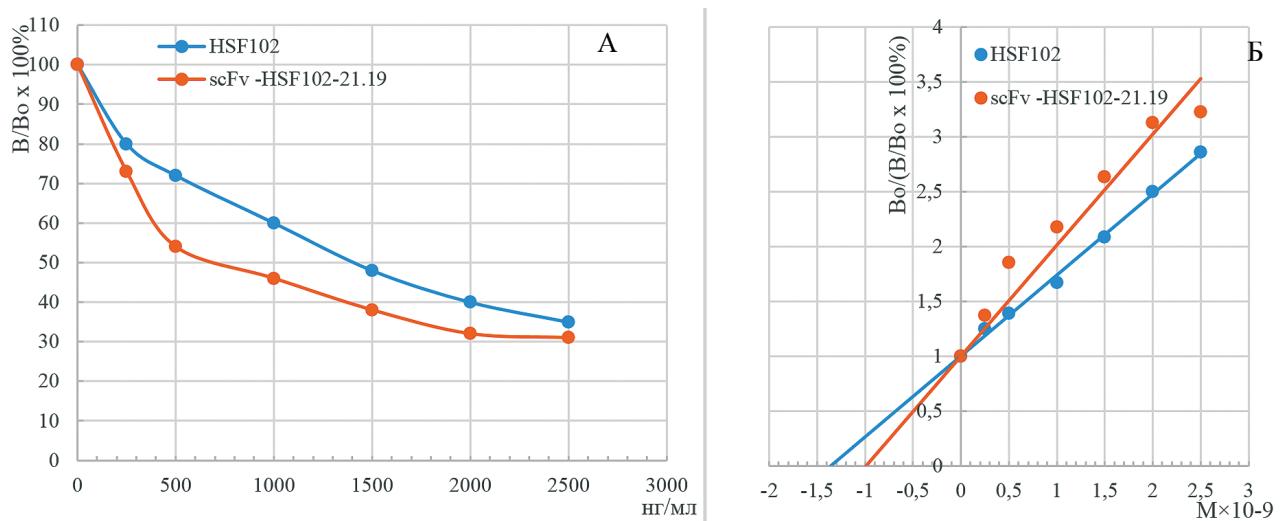


Рисунок 4 – А) Определение параметров связывания ферритина полноразмерных моноАт HSF102 и scFv-HSF102-21.19. Б) Определение констант взаимодействия полноразмерных моноАт HSF102 и scFv-HSF102-21.19 методом двойных обратных величин

Результаты показали различную антигенсвязывающую способность фрагментов scFv-HFS102-21.11, scFv-HFS102-21.14 и scFv-HFS102-21.19.

Анализ антигенсвязывающей способности scFv фрагментов моноклонального антитела HFS 102 с использованием конкурентного ИФА показал, что аффинность связывания фрагмента scFv-HSF102-21.11 в 6 раз выше, чем у полноразмерного моноАт HSF102.

В то же время аффинность конструктов scFv-HSF102-21.14, scFv-HSF102-21.19 к ферритину в 1,5 и 2,5 раза выше, в сравнении, с полноразмерным антителом к ферритину человека HSF102.

Заключение. Алтернативным методом получения антител является создание их рекомбинантных аналогов. Этот подход позволяет получать высокоочищенные препараты рекомбинантных антител, а также изменять их свойства с помощью генно-инженерных методов.

Использование генноинженерных методов позволяет экспрессировать легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов, как индивидуальные белки, создавать целый набор разнообразных фрагментов антител, а также изменять такие свойства антител, как аффинность, число и специфичность паратопов, состав доменов, подвижность молекулы, пространственную ориентацию участков связывания с антигеном, молекулярный вес, изоэлектрическую точку и потенциальную иммуногенность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahmad, Z. A. scFv antibody: principles and clinical application. Clin. Dev. / Z. A. Ahmad // Immunol. – 2012. – V.87. – P. 42–49
2. Aina, O. H., Recent Innovations in Peptide Based Targeted Drug Delivery to Cancer Cells / R. Liu, J. L. Sutcliffe, et al. // Mol. Farm. – 2007. – V. 4. – P. 631–651.
3. Carter, P.J. Potent antibody therapeutics by design. Nat Rev / P.J. Carter // Immunol. – 2006. – № 6. – P. 343–357.