



УДК 615.37:578.825:616-006.04:57.083.3

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ГУМАНИЗИРОВАННОГО АНТИТЕЛА К РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНОМУ АНТИГЕНУ PRAME

© 2025 г. М. В. Ларина*, #, Ю. П. Финашутина**, Н. А. Кравчук**, В. А. Мисюрин**, В. Н. Новоселецкий***, Д. С. Балабашин*, О. Н. Солопова**, Д. В. Соколова**, В. С. Покровский**, Д. А. Долгих*, ****, Т. К. Алиев*, *****, А. В. Мисюрин*****, М. П. Кирпичников*, ***

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** ФБГУ “НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина”, Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23

*** Biology Department, Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen, 518000 China

**** Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, 119192 Москва, Ленинские горы, 1с12

***** Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет, Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1с3

***** ФГБУН “Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова” Российской академии наук, Россия, 117437 Москва, ул. Профсоюзная, 104

Поступила в редакцию 23.06.2025 г.

После доработки 13.07.2025 г.

Принята к публикации 14.07.2025 г.

Антиген PRAME (Preferentially expressed Antigen in Melanoma), относящийся к группе раково-тестикулярных антигенов и экспрессирующийся в различных типах опухолей, представляет собой привлекательную мишень для направленной терапии онкологических заболеваний. В данной работе на основе моноклонального антитела 6H8 к белку PRAME было получено гуманизированное антитело 6H8Hu, которое было наработано в клетках CHO. Было показано, что гуманизированное антитело сохраняет высокую аффинность родительского МАТ по отношению к антигену (1.2 нМ), связывается как с рекомбинантным, так и с нативным белком PRAME, оказывает ингибирующее действие на пролиферацию PRAME+ клеточной линии меланомы человека Mel 1br, а также ингибирует рост опухолевых узлов *in vivo* в степени, сравнимой с действием мышиного антитела 6H8 и цитостатика мелфалана.

Ключевые слова: PRAME, гуманизированные антитела, иммунотерапия опухолей

DOI: 10.31857/S0132342325050174

ВВЕДЕНИЕ

Антиген PRAME, представляющий собой значимую мишень для моноклональных антител, – онкоспецифический маркер, который активен на всех стадиях дифференцировки опухолевых клеток, и вызывает спонтанный Т-клеточный ответ. Иммуногенность опухолевых клеток во многом

опосредована активностью раково-тестикулярных антигенов (РТА), к группе которых относится и PRAME. Эти антигены экспрессируются в различных тканях эмбриона, но неактивны у взрослого человека, за исключением клеток гамет. Поскольку гаметы расположены в иммунопривилегированных областях организма человека, раково-

Сокращения: а.о. – аминокислотный остаток; МАТ – моноклональные антитела; PBS – фосфатно-солевой буфер; CHO – клетки опухоли яичников китайского хомячка; SOE – ПЦР – полимеразно-цепная реакция с перекрывающимися областями (Splicing by Overlap Extension PCR); CDR – complementarity determining region (участки, определяющие комплементарность); FR – framework regions (каркасные участки); VH и VL – переменные домены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов; CH – константные домены тяжелой цепи иммуноглобулинов; Ск – константные домены легких цепей иммуноглобулинов.

Автор для связи: (тел: +7 (916) 179-25-09; эл. почта: marya.larina@gmail.com).

тестикулярные антигены не могут быть представлены иммунной системе.

Белок PRAME был открыт при исследовании причин спонтанной ремиссии меланомы у человека в 1997 году [1]. Опухолевые клетки больного LB33, из которых была получена клеточная линия, подвергались атаке аутологических CD8-позитивных Т-клеток. Белок PRAME состоит из 509 аминокислотных остатков, в его структуре было выявлено большое количество потенциальных Т-клеточных эпитопов. Наиболее подробно изучено взаимодействие пептидов белка PRAME с молекулой главного комплекса гистосовместимости HLA-A2 – наиболее распространенным вариантом в генотипе европейской популяции. Из множества предсказанных пептидов 19 демонстрировали высокую аффинность связывания с молекулой HLA-A2 [2]. Большое разнообразие иммуногенных эпитопов делает белок PRAME очень привлекательным для использования в терапии. Однако остальные известные раковотестикулярные антигены (РТА), такие как MAGE-A3, SSXIP2, HAGE и некоторые другие, реже по сравнению с PRAME вызывают Т-клеточный иммунный ответ [3–7]. Белок PRAME относится к группе раково-тестикулярных антигенов, экспрессирующихся в различных типах опухолей за исключением семенников и в ограниченной степени в клетках яичников, эндометрия и надпочечников. Было показано отсутствие экспрессии *PRAME* или ее низкий уровень в большинстве нормальных тканей, однако этот антиген экспрессируется не только в солидных опухолях, но и при лейкемии [8].

Ранее нами в результате иммунизации мышей рекомбинантным белком PRAME было получено МАТ 6Н8, характеризующееся высокой аффинностью по отношению к антигену PRAME. Целью нашей работы была гуманизация МАТ 6Н8, исследование его антиген-связывающих свойств, влияния на пролиферацию PRAME-экспрессирующей клеточной линии меланомы Mel 1br, а также на ингибирование роста опухоли Mel-P в иммунодефицитных мышах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн и конструирование гуманизированного антитела 6Н8Hu. Для снижения иммуногенности мышиных МАТ и избежания возможных неблагоприятных реакций при использовании в качестве терапевтического препарата, антитела или их части могут быть гуманизированы.

Для гуманизации мышиного МАТ 6Н8 к белку PRAME был использован подход, основанный

на пересадке гипервариабельных участков (CDR – Complementarity-determining region – гипервариабельные участки) мышиного МАТ на каркасные (FR – framework region) области антитела человека. Для гуманизации были использованы последовательности генов зародышевой линии иммуноглобулинов человека.

Метод “пересадки CDR” заключается в нахождении последовательностей зародышевых линий антител человека, наиболее гомологичных последовательностям моноклональных мышиных антител, и создании гибридных молекул, содержащих каркасные участки антител человека и гипервариабельные участки исходных мышиных антител. Путем сравнения с последовательностями зародышевых линий человека в сервисе IgBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) определяли наиболее гомологичные антителу 6Н8 зародышевые линии антител человека и отбирали линии с большей степенью гомологии и меньшим числом неблагоприятных замен. Для легкой цепи моноклонального антитела 6Н8 наибольшую степень гомологии демонстрировала последовательность линии IGKV1-39*01 для V-сегмента и IGKJ4*02 для J-сегмента, а для тяжелой цепи наиболее гомологичный V-сегмент относится к зародышевой линии IGHV1-2*02 и J-сегмент к линии IGHJ4*01.

Участки CDRs оставляли без изменения, а каркасные участки мышиного антитела заменяли на гомологичные человеческие.

Оптимизацию получаемых последовательностей проводили путем создания моделей пространственной структуры гуманизированного антитела методом моделирования на основании гомологии (веб-сервис Rosetta Antibody). Реализация этого метода включала следующие шаги: 1) поиск шаблонов среди антител с известной пространственной структурой и сходной аминокислотной последовательностью, 2) построение начальных моделей с использованием консервативных фрагментов шаблонов и VH/VL последовательности запроса, 3) улучшение начальных моделей путем подбора оптимальных конформаций основной цепи VH/VL и боковых цепей по всем моделям в целом. Полученные стартовые модели дополнительно оптимизировали с учетом окружающего растворителя, для чего в программе Gromacs (<http://www.gromacs.org/>) с использованием силового поля charmm36 проводили расчет молекулярной динамики (МД) моделей в водном растворе при температуре 300K и физиологической концентрации NaCl в течение 10 нс.

Анализ полученных моделей позволил сформулировать ряд возвратных замен в каркасных участках VH и VL гуманизированного антитела к PRAME. Введенные аминокислотные замены в каркасных областях легкой и тяжелой цепей мышиного антитела 6H8 в ходе гуманизации не оказали существенного влияния на ход основной цепи углеродного скелета, и модельные структуры переменных доменов мышиного антитела 6H8 и гуманизированного антитела 6H8Hu демонстрируют высокое структурное сходство (СКО по Ca -атомам 1.1 Å). Конформация боковых цепей остатков, образующих вероятную поверхность паратопа, так же не претерпела значительных изменений. Однако в ближайшей окрестности паратопа произошел ряд изменений.

Так, боковая цепь остатка Q70 в легкой цепи мышиного антитела взаимодействует с боковой цепью остатка R24 лишь посредством водородной связи, при чем конформация обеих боковых цепей вытянутая. При введении замены распределение электростатического потенциала изменится и, как следствие, происходит взаимодействие с остатком R24, причем обе боковые цепи изгибаются навстречу друг другу. Такое изменение распределения электростатического потенциала может негативно сказаться на взаимодействии антитела с PRAME. Аналогично, в тяжелой цепи остаток D65 в мышином антителе взаимодействует с остатком K64, ограничивая его подвижность. Введение замены S82bR с противоположной стороны приводит к ослаблению взаимодействия D65 с K64 и смещению последнего в область, прилегающую к паратопу антитела. Таким образом, для того чтобы конформация паратопа гуманизированного анти-

тела соответствовала конформации паратопа мышиного антитела и взаимодействие с эпитопом сохранялись, было решено ввести дополнительные возвратные мутации в последовательности FR-участков зародышевой линии человека. Были введены следующие возвратные мутации: в последовательность FR3 легкой цепи D70Q, и в последовательность FR3 тяжелой цепи – R82bS. Кроме того, для сохранения конформации боковой цепи остатка D55 тяжелой цепи одновременно с возвратной мутацией R71A была сделана мутация T73K, восстанавливающая распределение электростатического потенциала возле остатка D55 и ионную связь с ним.

Получение рекомбинантных химерного мАТ 6H8chim и гуманизированного мАТ 6H8Hu.

Рекомбинантные мАТ, химерное 6H8chim (включающее в себя переменные домены родительского мышиного антитела и константные домены легкой каппа-цепи и тяжелой цепи IgG1 человека) и гуманизированное 6H8Hu, получали методом транзientной экспрессии в клетках CHO. После культивирования клеток очистку рекомбинантных антител из культуральной среды проводили методом аффинной хроматографии с использованием Protein A-сефарозы. Чистоту полученных мАТ оценивали с помощью методов электрофореза в ПААГ и гель-фильтрационной хроматографии (рис. 1). В очищенных препаратах рекомбинантных мАТ были выявлены тяжелые и легкие цепи, характеризующиеся подвижностью в ПААГ в восстанавливающих условиях, соответствующей расчетным молекулярным массам 50 и 25 кДа (рис. 1а).

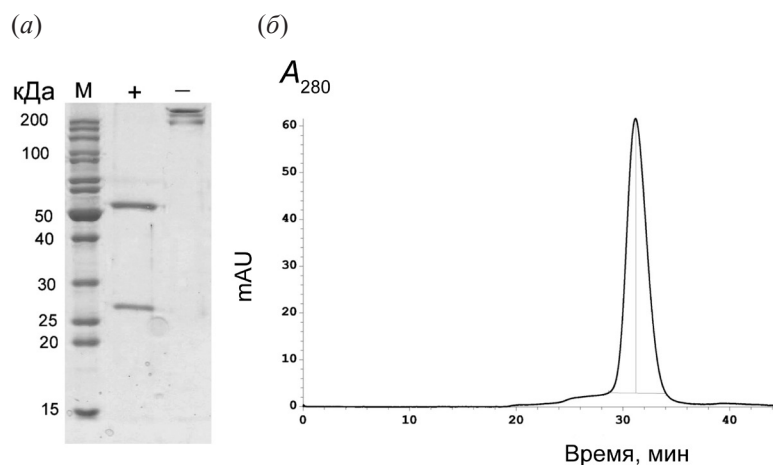


Рис. 1. Оценка чистоты препарата рекомбинантного антитела 6H8Hu. (а) – Электрофореграмма препарата антитела 6H8Hu в 10% ДСН-ПААГ, (+) – 3 мкг мАТ 6H8Hu восстанавливающих условиях, (–) 3 мкг мАТ 6H8Hu невосстанавливающих условиях, М – маркер молекулярных масс. (б) – Аналитическая гель-фильтрационная хроматография очищенного мАТ 6H8Hu.

Исследование мАТ 6Н8Нu иммунохимическими методами. Связывание гуманизированного мАТ 6Н8Нu с антигеном PRAME и сравнение его с химерным аналогом проводили методом непрямого иммуно-ферментного анализа (ИФА). Для проведения ИФА использовали рекомбинантный белок PRAME, выделенный из культуры *E. coli*. В качестве отрицательного контроля использовали гуманизированное мАТ 1С5, специфичное по отношению к гликопротеину вируса бешенства. Результаты ИФА показали, что полученное в результате гуманизации мАТ 6Н8Нu связывается с антигеном PRAME аналогично химерному мАТ 6Н8chim, содержащему вариабельные домены родительского мАТ 6Н8. Таким образом, можно сделать вывод, что проведение гуманизации не повлияло на способность антитела к специфическому связыванию с антигеном (рис. 2).

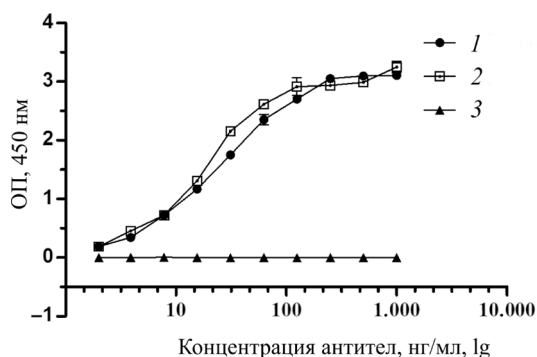


Рис. 2. Непрямой иммуноферментный анализ взаимодействия химерного мАТ 6Н8chim и гуманизированного мАТ 6Н8Нu с рекомбинантным белком PRAME. 1 – мАТ 6Н8Нu, 2 – 6Н8chim, 3 – мАТ 1С5.

Специфическое связывание антитела 6Н8Нu к антигену PRAME также оценивали по его способности связываться как с рекомбинантным, так и с нативным белком PRAME в опухолевых клеточных линиях, экспрессирующих данный белок, методом Вестерн блоттинга. Для этой цели были использованы PRAME-позитивные клеточные линии MelP и K562, а линию эмбриональных фибробластов WI-38, не экспрессирующую белок PRAME, использовали как отрицательный контроль. Как показано на рис. 3, использование мАТ 6Н8Нu, так же как и мАТ 6Н8, позволяло детектировать рекомбинантный, а также эндогенный белок PRAME.

При анализе антител методом иммуноблоттинга было показано, что все исследуемые антитела распознают рекомбинантный белок PRAME в виде полосы, соответствующей размеру белка 60 кДа. Также антитела распознавали нативный

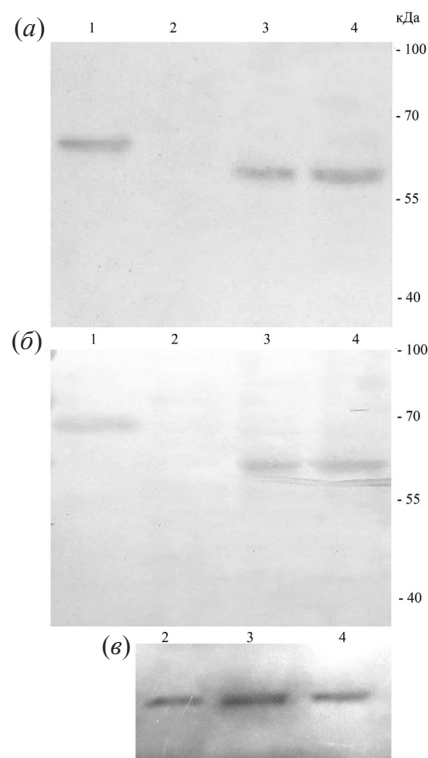


Рис. 3. Результаты иммуноблоттинга рекомбинантного белка и лизатов клеток с антителами к PRAME. Для анализа использовали 0.5 мкг рекомбинантного белка на дорожку и 30 мкг общего белка лизатов клеток. 1 – Рекомбинантный белок PRAME; 2 – эмбриональные фибробласты WI-38; 3 – линия меланомы MelP; 4 – линия миелоидного лейкоза K562. (а) – мАТ 6Н8; (б) – мАТ 6Н8Нu; (в) – актин.

белок в лизатах опухолевых клеток линий меланомы человека MelP и миелоидного лейкоза K562, где ген *PRAME* экспрессируется на высоком уровне (данные не приведены). В клетках человеческих фибробластов, в которых ген *PRAME* не экспрессируется, связывание ни одного антитела с белком не было обнаружено.

Определение аффинности химерного мАТ 6Н8chim и гуманизированного мАТ 6Н8Нu. Аффинность химерного мАТ 6Н8chim и гуманизированного антитела 6Н8Нu измеряли на биосенсоре, использующим технологию QCM (quartz crystal microbalance) Attana Cell A200. Для этого через чип с иммобилизованным на нем рекомбинантным белком PRAME пропускали различные концентрации исследуемых мАТ. Кинетические параметры ассоциации и диссоциации были записаны и представлены в виде сенсограмм на рис. 4б для гуманизированного мАТ 6Н8Нu и рис. 4а для химерного мАТ 6Н8chim. Для расчета константы диссоциации (K_D) использовали модель связывания 1 : 2. Константу диссоциации оп-

ределяли, как соотношение k_{off}/k_{on} . Как показано на рис. 4, мАТ 6Н8Нu характеризуется высокой аффинностью по отношению к белку PRAME, при этом K_D составляет 1.2 нМ, что сравнимо с K_D химерного антитела 6Н8chim, равной 0.5 нМ.

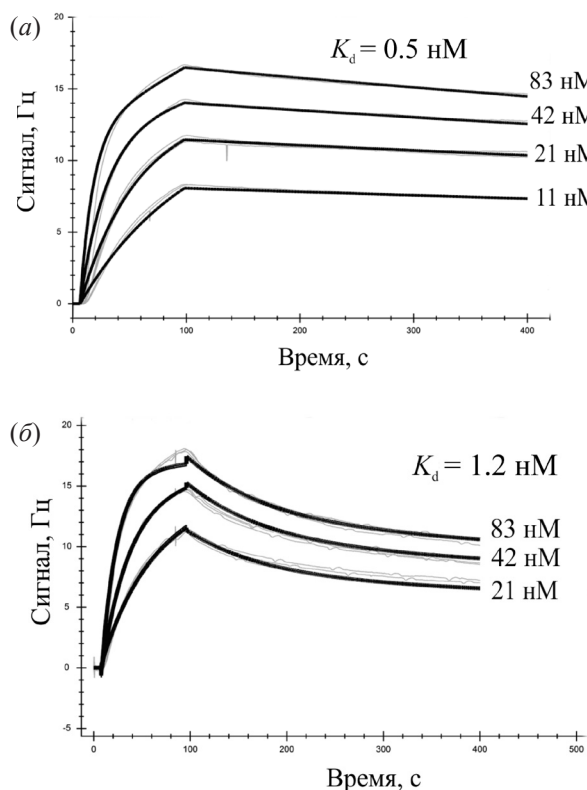


Рис. 4. Анализ связывания гуманизированного мАТ 6Н8chim (а) и мАТ 6Н8Нu (б) с белком PRAME для определения K_D с использованием биосенсора Attana.

Антипролиферативная активность гуманизированного мАТ 6Н8Нu. Анализ влияния гуманизированного антитела 6Н8Нu на пролиферацию опухолевых клеток проводили в режиме реального времени с использованием системы xCELLigence.

Изменение клеточной пролиферации на приборе с использованием системы xCELLigence можно наблюдать в режиме реального времени за счет измерения прибором электрического импеданса. Электрический импеданс, который измеряется прибором при контакте плазматической мембраны клетки с поверхностью электрода, выражается в изменении электрического потенциала

клетки. Изменение величины электрического импеданса под действием каких-либо агентов показывает изменение клеточного индекса. Данные изменения выражаются в виде графика в логарифмической системе координат в режиме реального времени.

Для изучения антипролиферативного действия химерного 6Н8chim и гуманизированного мАТ и 6Н8Нu на PRAME-позитивные опухолевые клетки проводили серию экспериментов по измерению клеточного индекса линии меланомы человека MelIbr совместной инкубации с гуманизированным антителом 6Н8Нu и химерного мАТ 6Н8chim с конечными концентрациями в лунке 100 мкг/мл.

Согласно полученным данным, скорость роста клеток линии Mel Ibr была статистически значимо меньшей в условиях, когда в культуральной среде присутствовали антитела к антигену PRAME. Наибольшее замедление скорости роста наблюдалось при инкубировании с химерным антителом 6Н8chim (табл. 1, рис. 5).

Полученные данные о значениях импеданса для времени инкубации в течение 40, 60 и 80 ч после добавления мАТ к клеткам Mel Ibr позволили оценить наличие антипролиферативной активности мАТ к антигену PRAME. По сравнению с клетками Mel Ibr, растущими при добавлении к ним только ФСБ, для клеток, инкубированных с антителами против PRAME, наблюдалось замедление клеточного роста. Наибольшее статистически значимое снижение скорости пролиферации клеток Mel Ibr после добавления к ним как химерного мАТ 6Н8chim, так и гуманизированного антитела 6Н8Нu наблюдалось после инкубации в течение 24 ч после добавления мАТ, и составило 61.5 % ($p = 0.0001$) и 53.6 % ($p = 0.0001$) по сравнению с контролем, соответственно. Антипролиферативная активность мАТ к PRAME после инкубации с клетками в течение 24 ч была максимальной, но постепенно снижалась, и составляла после 48 ч для мАТ 6Н8chim 55% и мАТ 6Н8Нu 44.7%, а после 72 ч инкубации – 29.7 и 15.7%, соответственно.

Таким образом, было показано, что гуманизированное антитело 6Н8Нu обладает антипролиферативной активностью по отношению к клеткам линии Mel Ibr, как и химерное мАТ 6Н8chim, при сравнении с ФСБ. Полученные данные подтверждают сохранение антипролиферативной активности мАТ 6Н8 после гуманизации.

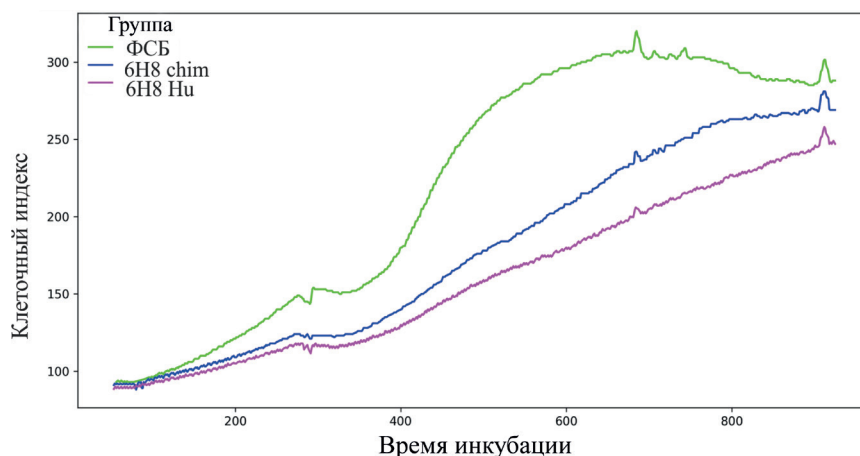


Рис. 5. Изменение клеточного индекса клеток линии Mel P при их инкубации с гуманизированным и химерными антителами (6H8Hu и 6H8chim) с конечной концентрацией в лунке 100 мкг/мл (зеленая линия - фосфатно-солевой буфер, синяя линия – 6H8chim, 100 мкг/мл, розовая линия – 6H8Hu, 100 мкг/мл).

Таблица 1. Медиана значения импеданса для исследованных клеточных линий

Антитело, PBS	Концентрация, мкг/мл	Медиана значения импеданса для линий, 24 ч	Медиана значения импеданса для линий, 48 ч	Медиана значения импеданса для линий, 72 ч
6H8Hu	100	0.77*	1.51*	2.1*
6H8chim	100	0.64*	1.23*	1.75*
PBS	0	1.66	2.73	2.49

* Наблюдалось статистически значимое отличие в скорости роста клеток по сравнению с контролем без антитела ($p < 0.00001$).

Ингибирование роста опухоли Mel-P в иммунодефицитных мышах. При разработке схемы эксперимента была выбрана PRAME- позитивная линия меланомы человека Mel-P, способная формировать опухолевые узлы при подкожной трансплантации у бестимусных мышей. Действие препарата, основу которых составляют гуманизированные антитела, может иметь несколько механизмов: блокирование активности белка-мишени при помощи антигенсвязывающего фрагмента и стимулирование иммунных реакций организма при помощи связывания Fc-фрагментом поверхности иммунных клеток и, в частности, молекул комплемента.

Несмотря на то, что связывание PRAME само по себе оказывает цитостатическое действие на опухоль, полностью раскрыть противоопухолевый потенциал антитела можно лишь с участием эффекторных функций, опосредованных его Fc-фрагментом. Принимая во внимание видоспецифичность связывания гуманизированного и химерного антител с Fc-рецептором иммунных клеток, для более полной оценки противоопухолевой активности антител, содержащих Fc-фрагмент человека, требуется присутствие человеческих иммунных клеток. В качестве эффектор-

ных клеток мышам могут быть введены мононуклеары периферической крови человека или МПК. Учитывая, что МПК не способны в отличие от опухоли размножаться в организме мыши, лечение должно быть начато сразу, пока соотношение опухоль: МПК остается достаточно низким для осуществления противоопухолевого действия МПК. Все это диктует следующую схему проведения эксперимента: приготовление смешанной суспензии опухоль-МПК и ее подкожная имплантация, немедленно начатое лечение препаратом антител, оценка динамики развития опухолевых узлов в опытных и контрольных группах мышей.

Препарат, представляющий собой гуманизированное антитело против PRAME, вводили внутривенно, такой путь введения был выбран по результатам изучения мирового опыта исследований терапевтических антител.

По результатам измерений был вычислен средний объем опухолевых узлов и построен график динамики роста опухолевых узлов.

Было показано, что использовавшиеся в качестве положительных контролей, мышинное антитело 6H8 и цитостатик мелфалан ингибиро-

вали рост ксенотрансплантатов Mel-P по сравнению с ФСБ и антителом 1C5, использовавшимися в качестве отрицательного контроля.

Динамика роста опухолевых узлов в ксенотрансплантатах MelP в клеточных моделях *in vivo* показана на рис. 6.

Гуманизированное антитело 6H8Hu в дозировке 5 мг/кг ингибирует рост опухолевых узлов в степени, сравнимой с действием мышиного антитела 6H8 и цитостатика мелфалана.

Таким образом, проведение гуманизации не повлияло на антипролиферативные свойства антитела 6H8. Полученное гуманизированное антитело 6H8Hu можно рассматривать в качестве перспективного кандидата для дальнейшего исследования антипролиферативной активности в отношении PRAME-экспрессирующих клеточных линий.

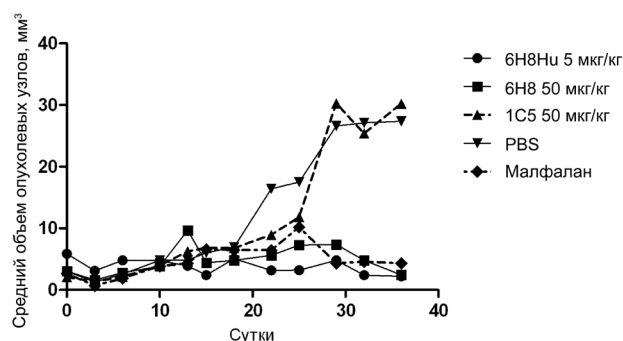


Рис. 6. Динамика роста опухолевых узлов у ксенотрансплантатов MelP на клеточных моделях *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реактивы и клетки: питательная среда DMEM, питательная среда RPMI 1640, эмбриональная телячья сыворотка (FCS), L-глутамин, раствор пенициллин-стрептомицин-фунгизон (Anti-anti) (Invitrogen, США), флаконы и планшеты для культивирования эукариотических клеток (Greiner Bio One, США), планшеты для ИФА (Nunc Maxisorp, Thermo Scientific, Дания), однокомпонентный субстрат тетраметил бензидин (TMB) (НПО "БиотестСистемы", Россия), эндонуклеазы рестрикции (Thermo Scientific, США), ДНК-полимеразу Tersus (Евроген, Россия), DMSO (Sigma), бактоагар, дрожжевой экстракт, триптон (BD, Франция), штаммы *E. coli* XL1_Blue (a,b 3 recA1 endA1 gyrA96 thi_1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proABlacIq-ZAM15 Tn10 (Tetr)]) (Stratagene, США). Остальные химические реактивы были получены из коммерческих источников и использованы без предварительной очистки.

Оборудование: наноспектрофотометр Implen P300; камера для горизонтального электрофореза 15*20 Хеликон, камера для вертикального электрофореза Bio-Rad Mini-Protean 3 cell, источник питания PowerPack Basic (Bio-Rad, США); колонка с носителем HiTrap MabSelect Sure объемом 5 мл (GE Healthcare Life Sciences, США), хроматограф ActaPure 25, суперпетля объемом 150 мл, колонка Superdex 200 GL объемом 23.5 мл (GE Healthcare Life Sciences, США).

Клеточные линии: линия меланомы человека Mel Ibr, линия меланомы человека Mel-P. Животные: бестимусные мыши линии BALB/c Nu/Nu.

Конструирование экспрессионных векторов для получения рекомбинантных химерного мАТ 6H8chim и гуманизированного мАТ 6H8Hu. Получение экспрессионных векторов, кодирующих легкую и тяжелую цепи химерного мАТ 6H8chim и гуманизированного мАТ 6H8Hu, проводили как описано ранее [9].

Получение экспериментальных образцов рекомбинантных мАТ. Клетки яичника китайского хомячка CHO использовали для транзientной секретируемой экспрессии рекомбинантного гуманизированного мАТ 6H8Hu и химерного мАТ 6H8chim. Для этого клетки культивировали в колбах Эрленмейера в CO₂-инкубаторе при 37°C, 95% влажности и 8% CO₂ в стандартной бессывороточной среде CD OptiCHO (Invitrogen) с добавлением 200 мМ раствора L-Глутамина до конечной концентрации 8 мМ и содержащей 0.18% (v/v) Pluronic F-68 (Invitrogen, USA) до концентрации 4 x 10⁶ клеток/мл 24 ч до трансфекции. Во флаконы Эрленмейера объемом 125 мл засевали 30 мл клеточной суспензии (4.5 млн клеток) при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере с частотой 130 об/мин и через 20–24 ч проводили трансфекцию с использованием трансфецирующего реагента Lipofectamine-3000 Transfection Kit (Invitrogen, USA) согласно стандартному протоколу производителя. Плазмидную ДНК добавляли к клеткам в виде ДНК-липосомного преципитата. После проведения трансфекции культуральный флакон инкубировали при температуре 37°C, 95%-й влажности, в атмосфере 8% CO₂ и непрерывном перемешивании 130 об/мин. После 7–9 дней инкубации культуры осаждали центрифугированием при 1200 оборотах/мин в течение 10 мин.

Выделение и очистка химерного мАТ 6H8chim и гуманизированного мАТ 6H8Hu. Выделение рекомбинантных антител из культуральной жидкости проводили на колонке с носителем HiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare) объемом 5 мл.

К культуральной жидкости добавляли 0.1 объема 10-кратного Tris-HCl буфера (200 mM Tris-HCl, 1.5 M NaCl pH 7.2) и наносили на предварительно уравновешенную колонку при скорости потока 2–3 мл/мин при давлении не более 0,5 МПа. Колонку промывали буфером Tris-HCl объемом равным 5 объемам колонки. Элюцию осуществляли с помощью глицинового буфера (0.1 M глицин, pH 3.0). Элюированный раствор нейтрализовали, добавляя 0,1 объема буфера для нейтрализации (1 M Tris pH 8.0). Полученный раствор белка диализовали против фосфатного буфера (0.01 M Na_2HPO_4 , 0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, pH 7.2) и стерилизовали через мембранные фильтры 0.22 мкм. Наличие и чистоту целевого белка в полученной фракции анализировали с помощью электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях в 10% -м ПААГ по методу Лэммли. В лунки вносили по 3 мкг исследуемого образца. В качестве стандартов молекулярных масс использовали смесь белков 10–200 кДа (Thermo Fisher Scientific, США). Для разделения белка в восстанавливающих условиях образцы анализировали в присутствии 2-меркаптоэтанола. Чистоту препарата определяли с помощью аналитической гель-фильтрационной хроматографии на колонке Superdex 200-10/300-GL (GE Healthcare) в 100 mM Tris-HCl буфере (pH 8.0), содержащем 150 mM NaCl.

Непрямой ИФА. Рекombинантный белок PRAME сорбировали в лунках иммунологического планшета в концентрации 2 мкг/мл в карбонатном буфере в течение ночи при температуре 4°C. Планшет 3 раза промывали буфером ФСБ-Т (фосфатно-солевой буфер с 0.05% Tween-20), затем блокировали раствором 0.5%-го БСА в ФСБ при комнатной температуре в течение 1 ч и промывали 3 раза ФСБ-Т. Антитела наносили в 100 мкл блокирующего буфера в концентрациях от 1000 нг/мл до 2 нг/мл, используя двукратные разведения. Планшет промывали 5 раз ФСБ-Т, наносили раствор антител против IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена (A9044, Sigma) в разведении 1 : 20000 и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшет промывали 7 раз ФСБ-Т, затем в лунки добавляли раствор субстрата – тетраметилбензидина (Иммунотех, Россия), реакцию останавливали, добавляя 50 мкл 10%-го раствора серной кислоты. Оптическое поглощение измеряли при длине волн 450 нм на планшетном спектрофотометре Microplate Reader 680 (BioRad, США).

Иммуноблоттинг. Рекombинантный белок PRAME и клеточные лизаты разделяли методом

электрофореза в ПААГ, после чего белки из геля переносили на ПВДФ-мембрану с использованием буфера для переноса (25 mM Tris, 192 mM глицин, 20% метанол, pH 8.5). Неспецифическую сорбцию на мембране блокировали 5% раствором БСА 2 ч при комнатной температуре и промывали три раза буфером ТБСТ (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6). После этого мембрану помещали в раствор различных антител к белку PRAME в конечной концентрации 3 мкг/мл и инкубировали при 4°C в течение ночи. После трехкратной промывки буфером ТБСТ мембрану инкубировали в растворе соответственного антивидового антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена, в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее мембрану 3 раза промывали раствором ТБСТ и добавляли однокомпонентный преципитирующий субстрат диаминобензидин. Мембрану инкубировали в течение 5–10 мин, после чего реакцию останавливали, промывая мембрану дистиллированной водой.

Определение аффинности химерного мАТ 6H8chim и гуманизированного мАТ 6H8Hu.

Константы диссоциации комплексов белка PRAME с химерным мАТ 6H8chim и гуманизированным антителом 6H8Hu измеряли на биосенсоре Attana Cell A200 (Attana, Швеция). Рекombинантный белок PRAME (40 мкг/мкл) иммобилизовали на LNB-carboxyl сенсорный чип, пришивая белок ковалентно через аминокислотные группы. Эксперименты по связыванию мАТ с рекombинантным белком PRAME проводили в буферном растворе HEPES, содержащем 0.005% полисорбата 20 (25 мкл/мин, 22°C).

Три серийных разведения химерного антитела 6H8Chim или гуманизированного антитела 6H8Hu (в концентрации 83.3–20.7 нМ) наносили на чип с иммобилизованным белком PRAME в трех повторах каждая в случайном порядке. Чип регенерировали раствором глицина 10 mM, pH = 1.5 в течение 30 с перед каждым циклом связывания. Перед каждой инъекцией антитела проводили инъекцию буфера, которую использовали как референс при обработке результатов с помощью программного обеспечения Attana Attester (Attana, Швеция). Для расчета константы диссоциации использовали модель связывания 1 : 2.

Ингибирование пролиферации клеточной линии Mellbr. Для изучения антипролиферативного действия химерного 6H8chim и гуманизированного мАТ и 6H8Hu на PRAME-позитивные опухолевые клетки проводили серию экспериментов по измерению клеточного индекса линии меланомы человека Mel Ibr с использованием

клеточного анализатора в режиме реального времени xCELLigence (ACEA Biosciences, США).

Клетки линии Mel Ibr инкубировали совместно с гуманизированным антителом 6H8Hu и химерным МАТ 6H8chim с конечными концентрациями в лунке 100 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля использовали клетки с добавлением ФСБ без добавления МАТ. Клеточную культуру Mel Ibr снимали с подложки с помощью среды RPMI 1640 (Sigma Aldrich, США) и ресуспендировали в той же среде. Подсчитывали концентрации клеток в камере Горяева и засеивали клетки в лунки 16-луночного культурального планшета с концентрацией 25000 клеток/мл в среду с содержанием 10% фетальной бычьей сыворотки. Время инкубации клеток в лунках прибора xCELLigence составляло 24 ч при температуре 37°C и содержании CO₂, равном 5%. После к клеткам в лунках культурального планшета добавляли гуманизированное антитело 6H8Hu, химерное МАТ 6H8chim до конечной концентрации 100 мкг/мл, либо ФСБ. Был рассчитан процент ингибирования пролиферации клеток Mel Ibr по сравнению с контролем по следующей формуле:

$$\text{Ингибирование} = \left(\frac{\text{Клеточный индекс ФСБ} - \text{Клеточный индекс 6H8Hu}}{\text{Клеточный индекс ФСБ}} \right) \times 100\%,$$

где клеточный индекс ФСБ – клеточный индекс, полученный для линии Mel Ibr после инкубирования в течение 24 ч с ФСБ, и клеточный индекс 6H8 – клеточный индекс, полученный для линии Mel Ibr после инкубирования в течение 24 ч с одним из вариантов антитела 6H8 (мышинного или гуманизированного). Для статистического анализа данных был выбран t-критерий, поскольку полученные данные имели достаточно большой объем (более 500 таймстемпов), и позволяли не проводить проверку на нормальность распределения. Для проведения анализа были отобраны данные импеданса, соответствующие моменту добавления антител и ФСБ в культуральную среду, и все последующие, полученные перед достижением конечной точки эксперимента, соответствующей 72 ч с момента добавления антител. Различия признавались статистически значимыми при значении *p*-value менее 0.05. Для анализа использовалась библиотека scipy для языка python v.3.

Ингибирование роста опухоли Mel P в иммунодефицитных мышях. МПК в количестве 600 млн выделяли из крови, наслаивая ее поверх раствора Фиколла 1077. Пробирки центрифугировали в течение 20 мин при 3500 об/мин, отбирали интерфазу, содержащую фракцию МПК. Клетки отмывали раствором ФСБ с 1 мМ ЭДТА дважды, центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин,

подсчитывали их количество в камере Горяева, после чего ресуспендировали в полной ростовой среде DMEM, содержащей 40% телячьей сыворотки и 10% ДМСО, замораживали в парах азота и хранили в криохранилище. Перед использованием клетки размораживали, отмывали дважды в холодной бессывороточной среде и ресуспендировали в DMEM с 4% телячьей сывороткой.

Лечение начинали в день имплантации опухоли для того, чтобы могли быть задействованы функции Fc-фрагмента гуманизированных антител.

Мышей рандомизировали по массе тела и разбивали на группы по 5 мышей, всего 6 групп.

Готовили смесь клеток Mel P и моноклеаров периферической крови человека (МПК) из расчета 0.5 мл суспензии в ФСБ 10 млн МПК и 800000 Mel P на одно введение. Для билатерального введения всего было приготовлено 30 мл суспензии, содержащей 600 млн МПК и 48 млн клеток Mel P.

Клеточную суспензию делили на 60 равных частей по 0.5 мл и вводили мышам подкожно в область левого и правого бедра.

Схема лечения (слепое введение). Внутривентральное введение препарата по 1 мл на 0, 2, 4, 7 и 9-ый день начала эксперимента (всего 5 введений).

Опытный препарат. Гуманизированное антитело 6H8Hu в дозировках 50 мг/кг и 5 мг/кг.

Контрольные препараты: (1) гуманизированное антитело против вируса бешенства 1C5; (2) ФСБ; (3) неспецифический цитостатик мелфалан, показанный в том числе для лечения меланом; (4) мышинное антитело 6H8.

Группы мышей: № 1 6H8Hu 50 мг/кг или 330 нМ/кг в ФСБ; № 2 6H8Hu 5 мг/кг или 33 нМ/кг в ФСБ; № 3 1C5 гуманизированный 50 мг/кг или 330 нМ/кг в ФСБ; № 4: ФСБ; № 5 мелфалан 0.835 мг/кг или 2740 нМ/кг в ФСБ; № 6 6H8 мышинный 50 мг/кг или 330 нМ/кг в ФСБ.

Наблюдение и измерение опухолей. Измерение объемов опухолей в трех взаимоперпендикулярных осях 2 раза в неделю. Объемы определяли по формуле (1).

$$V = (a*b*c)*\pi/6. \quad (1)$$

Терминирование эксперимента осуществляли через 4 недели после последнего введения препарата путем эвтаназии животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе мышинного моноклонального антитела было сконструировано и получено гуманизированное антитело 6H8Hu, специфичное к раково-тестикулярному антигену PRAME – онко-

специфическому маркеру, активному на всех стадиях дифференцировки опухолевых клеток. Для гуманизации был использован подход, основанный на пересадке гипервариабельных участков мышиного антитела на каркасные области антитела человека. В результате анализа конформационных моделей вариабельных доменов мышиного и гуманизированного антитела были предложены аминокислотные замены в каркасных участках, позволяющие минимизировать структурные различия в паратопах мышиного и гуманизированного антител. Так, в последовательности FR3 каркасного домена легкой цепи была осуществлена возвратная замена D70Q, а в последовательности FR3 тяжелой цепи – R82bS. Кроме того, для сохранения конформации боковой цепи остатка D55 тяжелой цепи одновременно с возвратной мутацией R71A была сделана мутация T73K, восстанавливающая распределение электростатического потенциала возле остатка D55 и ионную связь с ним.

Гуманизированное мАТ 6H8Hu и контрольное химерное мАТ 6H8chim, были экспрессированы в транзientной культуре клеток CHO и очищены с применением метода аффинной хроматографии. Методами непрямого ИФА и иммуноблоттинга показано, что полученное в результате гуманизации мАТ 6H8Hu связывается как с рекомбинантным антигеном, так и с нативным антигеном PRAME из клеточных лизатов аналогично химерному мАТ 6H8chim, содержащему вариабельные домены родительского мышиного мАТ 6H8. Гуманизированное антитело 6H8Hu характеризуется высокой аффинностью по отношению к белку PRAME, при этом K_D комплекса антиген-антитело составляет 1.2 нМ, что сравнимо с K_D химерного антитела 6H8chim, равной 0.5 нМ.

Исследование антипролиферативной активности гуманизированного антитела 6H8Hu проводилось *in vitro* на клеточной линии меланомы Mel Ibr, а также *in vivo* на ксенотрансплантатах линии меланомы Mel-P у бестимусных мышей. Наибольшее статистически значимое снижение скорости пролиферации клеток Mel Ibr после добавления к ним как химерного мАТ 6H8chim, так и гуманизированного антитела 6H8Hu наблюдалось после инкубации в течение 24 ч после добавления мАТ, и составило 61.5 % ($p = 0.0001$) и 53.6 % ($p = 0.0001$) по сравнению с контролем, соответственно.

Исследование антипролиферативной активности на мышах проводили в присутствии мононуклеаров периферической крови человека в качестве эффекторных клеток, опосредующих Fc-зависимые

функции химерного и гуманизированного антител. Схема проведения эксперимента состояла из приготовления смешанной суспензии опухоль-МПК и ее подкожной имплантации, немедленно начатого лечения препаратом антител, оценки динамики развития опухолевых узлов в опытных и контрольных группах мышей. Гуманизированное антитело 6H8Hu в дозировке 5 мг/кг ингибирует рост опухолевых узлов в степени, сравнимой с действием мышиного антитела 6H8 и цитостатика мелфалана.

Таким образом, проведение гуманизации не повлияло на антипролиферативные свойства антитела 6H8. Полученное гуманизированное антитело 6H8Hu можно рассматривать в качестве перспективного кандидата для дальнейшего исследования антипролиферативной активности в отношении PRAME-экспрессирующих клеточных линий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2019-1249 от 10.06.2019, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60418X0204).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей в качестве объектов исследования. Информированное согласие не требовалось.

Работы проводились на мышах с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС), и правил проведения работ с экспериментальными животными.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ikeda H., Lethe B., Lehmann F., van Baren N., Baurain J.F., de Smet C., Chambost H., Vitale M., Moretta A., Boon T., Coulie P.G. // *Immunity*. 1997. V. 6. P. 199–208.
[https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80426-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80426-4)
2. Kessler J.H., Beekman N.J., Bres-Vloemans S.A., Verdijk P., van Veelen P.A., Kloosterman-Joosten A.M., Vissers D.C., ten Bosch G.J., Kester M.G., Sijts A., Wouter Drijfhout J., Ossendorp F., Offringa R., Melief C.J. // *J. Exp. Med.* 2001. V. 193. P. 73–88.
<https://doi.org/10.1084/jem.193.1.73>
3. Greiner J., Schmitt M., Li L., Giannopoulos K., Bosch K., Schmitt A., Dohner K., Schlenk R.F., Pollack J.R., Dohner H., Bullinger L. // *Blood*. 2006. V. 108. P. 4109–4117.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-023127>
4. Weber G., Caruana I., Rouce R.H., Barrett A.J., Gerdemann U., Leen A.M., Rabin K.R., Bollard C.M. // *Clin. Cancer Res.* 2013. V. 19. P. 5079–5091.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-13-0955>
5. Schneider V., Zhang L., Rojewski M., Fekete N., Schrezenmeier H., Erle A., Bullinger L., Hofmann S., Gotz M., Dohner K., Ihme S., Dohner H., Buske C., Feuring-Buske M., Greiner J. // *Int. J. Cancer*. 2015. V. 137. P. 2083–2092.
<https://doi.org/10.1002/ijc.29583>
6. Babiak A., Steinhäuser M., Gotz M., Herbst C., Dohner H., Greiner J. // *Oncol. Rep.* 2014. V. 31. P. 384–390.
<https://doi.org/10.3892/or.2013.2804>
7. Greiner J., Ringhoffer M., Simikopinko O., Szmaragowska A., Huebsch S., Maurer U., Bergmann L., Schmitt M. // *Exp. Hematol.* 2000. V. 28. P. 1413–1422.
[https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(00\)00550-6](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(00)00550-6)
8. Hermes N., Kewitz S., Staeger M.S. // *Curr. Cancer Drug Target.* 2016. V. 16. P. 400–414.
<https://doi.org/10.2174/1568009616666151222151818>
9. Larina M.V., Finashutina Y.P., Lyzhko N.A., Misyurin V.A., Novoseletsky V.N., Dolgikh D.A., Solopova O.N., Moysenovich A.M., Balabashin D.S., Aliev T.K., Misyurin A.V., Kirpichnikov M.P. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2022. V. 48. P. 360–371.
<https://doi.org/10.1134/S1068162022020133>

Study of the Antiproliferative Activity of a Humanized Antibody to the Cancer-Testis Antigen PRAME

M. V. Larina^{*,#}, Yu. P. Finashutina^{**}, N. A. Kravchuk^{**}, V. A. Misyurin^{**}, V. N. Novoseletsky^{***}, D. S. Balabashin^{*}, O. N. Solopova^{**}, D. V. Sokolova^{**}, V. S. Pokrovsky^{**}, D. A. Dolgikh^{*,****}, T. K. Aliev^{*,*****}, A. V. Misyurin^{*****}, and M. P. Kirpichnikov^{*,***}

[#] Phone: +7 (916) 179-25-09; e-mail: marya.larina@gmail.com

^{*} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10., Moscow, 117997 Russia

^{**} N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Kashirskoye s., 23, Moscow, 115478 Russia

^{***} Biology Department, Shenzhen MSU–BIT University, Shenzhen, 518000 China

^{****} Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/12, Moscow, 119192 Russia

^{*****} Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/3, Moscow, 119234 Russia

^{*****} Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, ul. Profsoyuznaya, 104, Moscow, 117437 Russia

The PRAME antigen (Preferentially Expressed Antigen in Melanoma), which belongs to the group of cancer-testis antigens and is expressed in various tumor types, represents an attractive target for targeted cancer therapy. In this study, a humanized antibody (6H8Hu) was developed based on the monoclonal antibody 6H8 specific to the PRAME protein. The antibody was produced in CHO cells. It was shown that the humanized antibody retains the high affinity of the parental mAb to the antigen (1.2 nM), binds to both recombinant and native PRAME protein, inhibits the proliferation of PRAME-positive human melanoma cell line Mel Ibr, and suppresses tumor nodule growth *in vivo* to a degree comparable to that of the murine antibody 6H8 and the cytostatic agent melphalan.

Keywords: PRAME, humanized antibodies, cancer immunotherapy