

АФФИННЫЕ СВОЙСТВА АНТИ-HER2 АНТИТЕЛ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО ИСТОЧНИКА

А.И. Щербаков¹, Е.Н. Кособокова¹, М.В. Пинюгина¹, Е.В. Шешукова², В.С. Косоруков¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; Россия, 119991 Москва, ул. Губкина, 3

Контакты: Вячеслав Станиславович Косоруков atgtga@mail.ru

Введение. Рецептор Her2 является важной мишенью противоопухолевой терапии при лечении рака молочной железы. В настоящее время в клинической практике применяют препарат на основе моноклональных антител анти-Her2 – трастузумаб. Трастузумаб производится в культуре животных клеток и стоит достаточно дорого. Разработана технология производства рекомбинантных антител в растительном продуценте *Nicotiana benthamiana* с высоким выходом очищенного белка.

Цель исследования – сравнение аффинных свойств рекомбинантных антител, полученных классическим способом в культуре клеток и полученных в растительной биомассе.

Материалы и методы. Рекомбинантные фитоантитела выделяли методом аффинной хроматографии из биомассы растений *N. benthamiana*, агроинфильтрованных векторными конструкциями. Сравнение аффинных свойств проводили методами иммуноцитохимической окраски клеток, конкурентного связывания нативным эпитопом с анализом методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты и заключение. В данной работе нами установлено, что антитела, экспрессированные в *N. benthamiana*, не уступают аналогам, полученным из клеток млекопитающих, в связывании антигена Her2 на поверхности мембран клеток SK-BR-3. В настоящей работе впервые показано, что полученные фитоантитела анти-Her2 не отличаются от трастузумаба по специфичному связыванию с антигеном Her2, а также с IV субдоменом рецептора Her2.

Ключевые слова: рак молочной железы, терапевтические антитела, продукция антител в растениях

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-95-100

AFFINITY PROPERTIES OF PLANT-MADE ANTI-HER2 ANTIBODIES

A.I. Scherbakov¹, E.N. Kosobokova¹, M.V. Pinyugina¹, E.V. Sheshukova², V.S. Kosorukov¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences; 3 Gubkina St., Moscow 119991, Russia

Introduction. The Her2 receptor is an important target for antitumor therapy in the treatment of breast cancer. Trastuzumab, based on anti-Her2 monoclonal antibodies, is used in clinical practice. Trastuzumab is produced by animal cells culture technology and is quite expensive. We use the technology of production of recombinant antibodies in the plants *Nicotiana benthamiana* with a high yield of final purified protein.

Objective. The aim of following study is a comparison of monoclonal antibodies received via classic cell culture technology and produced in plant biomass.

Materials and methods. Recombinant plant-made antibodies were isolated by affinity chromatography from the biomass of *N. benthamiana* plants agroinfiltrated by vector constructs. Comparison of affinity properties was carried out by immunocytochemical staining of cells and competitive binding using flow cytometry analysis.

Results and conclusion. We show that the antibodies expressed in *N. benthamiana* are equal to those obtained from mammalian cells in binding to Her2 antigen localized on the surface of the SK-BR-3 cells. In the present work it was shown that the plant-made anti-Her2 antibodies do not differ in specific binding with the Her2 antigen, as well as with IV subdomain of the Her2 receptor.

Key words: breast cancer, therapeutic antibodies, plant-made antibodies

Введение

В мире ежегодно регистрируется более 1 млн новых случаев рака молочной железы (РМЖ), а в РФ более 50 тыс., вследствие чего это заболевание по-прежнему является актуальной и серьезной проблемой здравоохранения.

Около 25–30 % случаев РМЖ – это Her2-положительный РМЖ [1, 2]. Her2 (human epidermal growth factor receptor 2, человеческий рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа) – трансмембранная тирозиновая протеинкиназа ErbB2, молекулярная масса которой составляет 185 кДа. В организме

человека Her2 экспрессируется и в здоровых тканях. Для опухолевых клеток РМЖ характерна гиперэкспрессия Her2. Повышение уровня Her2 означает прогрессирование развития опухоли, так как он отвечает за рост опухоли. Также гиперэкспрессия Her2 вызывает ускоренное метастазирование и устойчивость к химиопрепаратам. Таким образом, рецепторы Her2 являются важной мишенью противоопухолевой терапии [3].

В конце 1990-х годов в клиническую практику был введен таргетный препарат на основе моноклональных антител – трастузумаб (герцептин; Genetech, Сан-Франциско, Калифорния). Механизм действия трастузумаба основан на том, что он обладает высоким сродством к рецептору Her2/neu и, связываясь с ним, предотвращает пролиферацию в клетках РМЖ. Применение трастузумаба смогло повысить эффективность лечения и продлить жизнь пациентов с Her2-положительным РМЖ. Показано, что использование трастузумаба в терапии РМЖ снижает риск развития отдаленных метастазов и тем самым увеличивает выживаемость пациентов [4]. Трастузумаб производится в культуре животных клеток и является дорогостоящим препаратом.

Классическая система получения терапевтических антител предполагает их экспрессию в генетически модифицированных культурах клеток. Технология достаточно дорогая и сложная. Альтернативой может быть получение рекомбинантных лекарственных препаратов, в частности терапевтических антител, в растениях методом транзитной экспрессии [5, 6]. Антитела, экспрессированные в растениях, не уступают аналогам, полученным из клеток млекопитающих, в противоопухолевой активности в отношении клеточных культур, которые экспрессируют Her2/neu на поверхности мембран [7, 8]. Способность к модификации системы гликозилирования растений позволяет получать антитела с профилем гликозилирования, близким к таковому у человека [9].

В настоящей работе впервые показано, что полученные фитоантитела анти-Her2 не отличаются от трастузумаба по специфичному связыванию с антигеном Her2, а также с IV субдоменом рецептора Her2/neu.

Материалы и методы

Накопление рекомбинантных антител в листьях.

Фитоантитела получали в листовой пластине *Nicotiana benthamiana* методом транзитной экспрессии. Полностью сформированные листья растения *N. benthamiana* обрабатывали агробактериями *Agrobacterium tumefaciens* (штамм GV3101), которые подвергаются трансформации соответствующими плазмидами pA16571 и pA16671, кодирующими легкую и тяжелую цепи антитела, в том числе плазмидой 35S-P19, кодирующей антисайленсинговый белок P19 [10]. По-

сле инкубации растений в течение 4–6 сут листья собирали и замораживали в жидком азоте.

Получение и очистка фитоантител анти-Her2.

Для внедрения вирусных векторов в клетки листьев *N. benthamiana* применяли методику агроинфекции. Инфицирование осуществляли культурами клеток штамма *A. tumefaciens* GV3101, которые были предварительно трансформированы конструкциями VTM-PT-NC и PVX-PT-LC. Эти конструкции обеспечивали экспрессию тяжелых и легких цепей рекомбинантного антитела анти-Her2 в клетках растения. Для повышения уровня экспрессии и наработки целевого белка использовали конструкцию, которая кодирует антисайленсинговый белок P19 вируса кустистой карликовости томатов.

Сбор листьев осуществляли через 3 сут после агроинфекции. Листья гомогенизировали и подвергали экстракции. Затем экстракт пропускали через систему фильтров и очищали методами аффинной и гель-фильтрационной хроматографии. Контроль и оценку уровня экспрессии фитоантител анти-Her2 осуществляли с помощью метода иммуоферментного анализа.

Экстракция целевого белка из листьев *N. benthamiana*. Листья измельчали в гомогенизаторе с добавлением буфера для экстракции (200 мМ натрия цитрат, 5 мМ этилендиаминтетраацетат, 0,1 % Tween 20, pH 6,0). Раствор фильтровали через фильтры 20, 1,2 и 0,2 мкм. Фильтрат наносили на колонку HiTrap MabSelect SuRe 5 мл (GE Healthcare, США). Элюцию проводили глицином 100 мМ pH 2,7. На финальном этапе очистки целевого белка применяли гель-фильтрационную хроматографию на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, США).

Иммуноцитохимический анализ гиперэкспрессии антигена Her2 с помощью фитоантител анти-Her2.

Клеточные линии SK-BR-3, полученные из банка клеточных культур ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, культивировали на стеклах в чашках Петри в среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ L-глутамин, пенициллин (25 000 Ед) – стрептомицин (25 000 мкг), пируват натрия, 0,1 % раствор аминокислот и 0,1 % раствор витаминов, при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Контроль прикрепления клеток осуществляли визуально под микроскопом. После прикрепления клеток к стеклу аккуратно наливали в чашку 8–10 мл среды. После образования клетками 80 % монослоя стекла промывали 2 раза в PBS (фосфатно-солевой буфер 2 мМ KH₂PO₄, 10 мМ Na₂HPO₄, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7,3), просушивали на воздухе. Затем наносили первичные антитела (фитоантитела анти-Her2/контрольные антитела) в разведении 1:500, инкубировали в течение ночи при +4 °С. На следующий день отмывали 2 раза в PBS

и наносили вторичные антитела против IgG человека, меченные FITC (флуоресцеин-5-изотиоцианатом). Инкубировали 45 мин при +4 °С во влажной камере. Отмывали стекла 2 раза в PBS в течение 5 мин, после этого наносили краситель для ядер Hoechst-33258 и инкубировали 15 мин во влажной камере. Промывали стекла 2 раза в PBS в течение 5 мин, просушивали и заключали под покровные стекла с помощью Fluorescent Mounting Medium (Daco, Дания).

Через сутки оценивали результаты на флуоресцентном микроскопе IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США).

Проточная цитофлуориметрия. Для оценки биологической активности фитоантител анти-Her2 был использован метод проточной цитофлуориметрии. Оценивалось связывание антител анти-Her2 с клетками SK-BR-3. Клеточные линии получены из банка клеточных культур ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Клетки SK-BR-3 собирали в количестве 5×10^5 и отмывали 2 раза в растворе PBS (pH 7,5). Клеточную суспензию (50 мкл) помещали в пробирки и инкубировали с 20 мкл образца антител в соответствующем разведении в течение 30 мин при комнатной температуре. После этого клетки отмывали PBS посредством центрифугирования при 1200 об/мин

в течение 7 мин. Далее клетки инкубировали с 20 мкл козьей антисыворотки против иммуноглобулинов человека, меченной FITC, в течение 30 мин при температуре 4 °С. После этого клетки отмывали 2 раза в растворе PBS и ресуспендировали раствором PBS, содержащим 1 % формалина и 0,1 % азида натрия.

Анализ результатов проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре BD FACS Cento II (Becton Dickinson, США) на базе программного обеспечения CellQuest. В качестве контрольного образца использовали препарат трастузумаб фирмы Roche.

Результаты

Анализ специфической активности фитоантител анти-Her2 *in vitro*. В процессе исследования активности полученных фитоантител анти-Her2 применяли иммуноцитохимический тест. Работу проводили с Her2-положительными клетками РМЖ SK-BR-3. Специфичность связывания тестировали с помощью кроличьих антител против антител человека, конъюгированных с пероксидазой хрена. В качестве положительного контроля выступали диагностические антитела, специфичные к Her2 (Dako, Дания), в качестве отрицательного – кроличьи антитела (рис. 1).

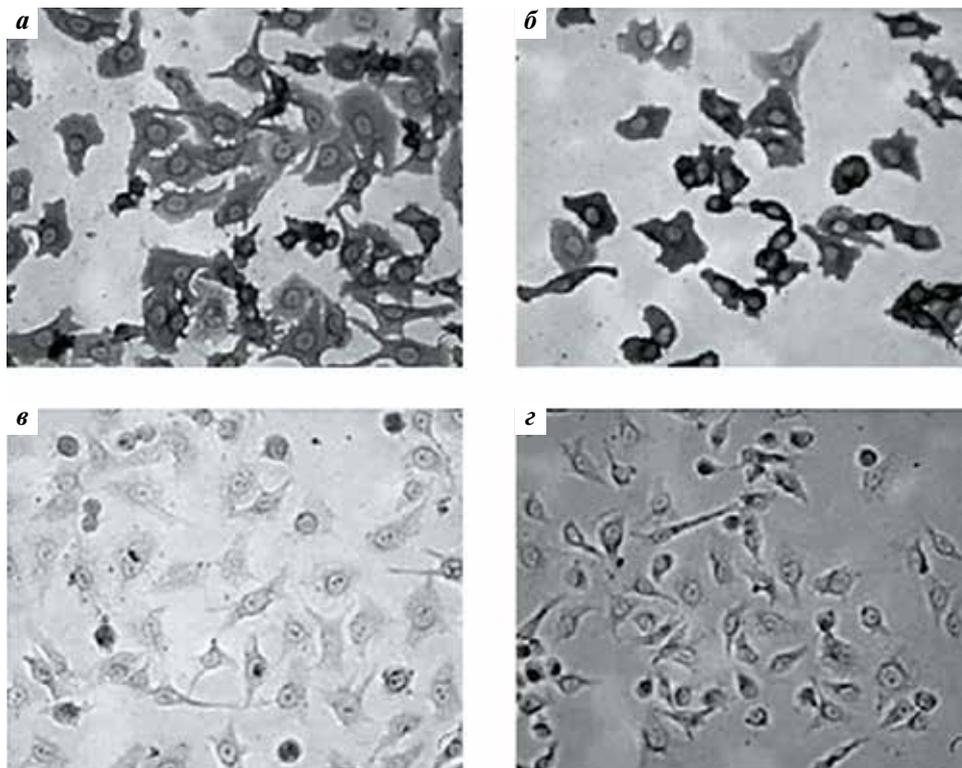


Рис. 1. Результаты анализа специфической активности полученных фитоантител анти-Her2: а – цитологический анализ клеток SK-BR-3, экспрессирующих онкоген Her2 и обработанных фитоантителами анти-Her2; б – клетки SK-BR-3 после обработки диагностическими антителами, специфичными к Her2; в и г – отрицательные контроли соответственно к а и б, полученные путем обработки клеток SK-BR-3 только кроличьими антителами

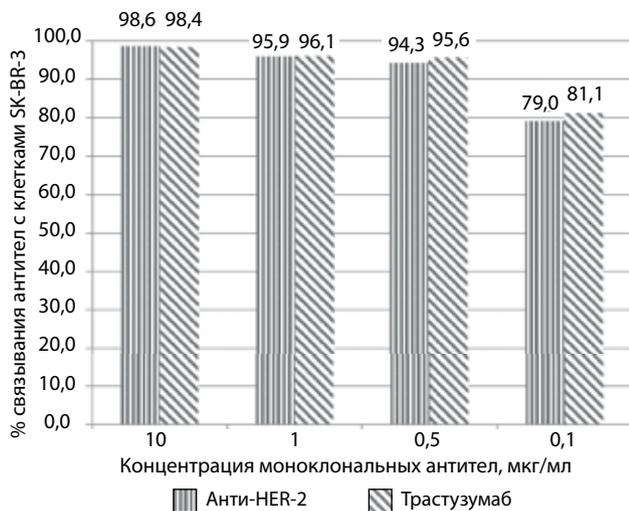


Рис. 2. Результаты связывания фитоантител анти-*Her2* с клетками SK-BR-3 при анализе на проточном цитофлуориметре

Сравнение эффективности специфического связывания анти-*Her2* фитоантител и трастузумаба с антигеном *Her2*. Для подтверждения связывания полученных фитоантител анти-*Her2* с рецептором *Her2* в сравнении с трастузумабом проводили серию экспериментов с *Her2*-положительными клетками РМЖ линии SK-BR-3 методом проточной цитофлуориметрии. В качестве контрольного образца использовали препарат трастузумаб.

В результате проведенных экспериментов был показан высокий процент связывания фитоантител анти-*Her2* с рецепторами *Her2* на поверхности клеток SK-BR-3 (от 69,1 до 100 % в зависимости от концентрации антител) (рис. 2). Этот результат идентичен данным, полученным при исследовании трастузумаба. Образцы фитоантител анти-*Her2* не отличаются по способности связываться с антигеном *Her2* на поверхности клеток РМЖ SK-BR-3 от препарата сравнения трастузумаба.

Анализ эффективности связывания фитоантител анти-*Her2* с IV субдоменом внеклеточного домена рецептора *Her2*. Для анализа связывания полученных фитоантител анти-*Her2* с IV субдоменом внеклеточного домена рецептора *Her2* была разработана методика анализа конкурентного связывания с антигеном *Her2* между фитоантителами анти-*Her2* и трастузумабом. Эксперимент осуществляли методом проточной цитофлуориметрии с использованием клеток, гиперэкспрессирующих антиген *Her2*, — SK-BR-3. Оценивалось связывание меченых антител анти-*Her2* с клетками SK-BR-3, обработанными фитоантителами анти-*Her2* или трастузумабом.

Для этого клетки SK-BR-3 предварительно обрабатывали фитоантителами анти-*Her2* либо трастузумабом, после чего инкубировали обработанные клетки с мечеными FITC образцами фитоантител

анти-*Her2* и трастузумаба различной концентрации (рис. 3). В случае если антитела связывают разные антигенные эпитопы, будет наблюдаться полноценное окрашивание клеток антителами, мечеными FITC. При совпадении эпитопов отмечается отсутствие или значительное снижение получаемого окрашивания. Проценты рассчитывали от 100 % окрашивания клеток без конкуренции соответствующим типом антител.

Полученные результаты показали, что при инкубации клеток SK-BR-3 как с фитоантителами анти-*Her2*, так и с трастузумабом происходило практически полное связывание рецепторов *Her2* на поверхности клеток с антителами и не оставалось свободных аффинных эпитопов.

В результате проведенных экспериментов выявлен низкий процент связывания фитоантител анти-*Her2*, меченных FITC, с рецепторами *Her2* на поверхности клеток SK-BR-3, обработанных трастузумабом (от 0,2 до 13,3 % в зависимости от концентрации антител). Аналогично показан низкий процент связывания трастузумаба, меченного FITC, с рецепторами *Her2* на поверхности клеток SK-BR-3, обработанных фитоантителами анти-*Her2* (от 0,8 до 13,8 % в зависимости от концентрации антител) (рис. 4). Результат идентичен данным, полученным при исследовании трастузумаба. Это свидетельствует о том, что образцы фитоантител анти-*Her2* связываются с тем же доменом антигена *Her2* на поверхности клеток РМЖ SK-BR-3, что и препарат сравнения — трастузумаб.

Обсуждение

Применение трастузумаба радикально изменило лечение РМЖ, в результате этого в руках онкологов появилось инновационное средство, которое смогло повысить эффективность лечения или продлить жизнь больных *Her2*-положительным РМЖ.

В нашей работе экспрессию и наработку фитоантител анти-*Her2* осуществляли в растениях *N. benthamiana*.

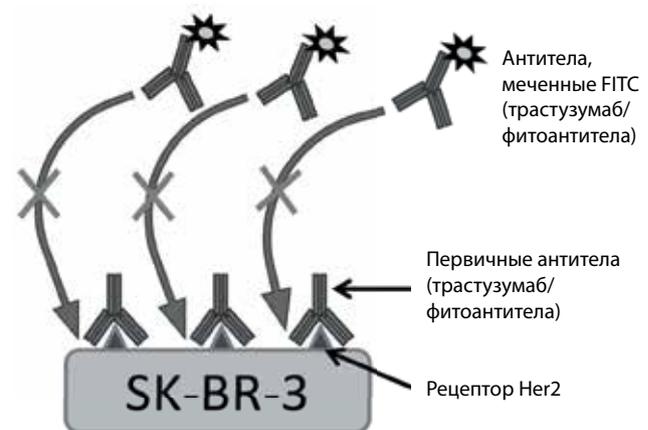


Рис. 3. Схема эксперимента конкурентного связывания рекомбинантных антител с клетками SK-BR-3

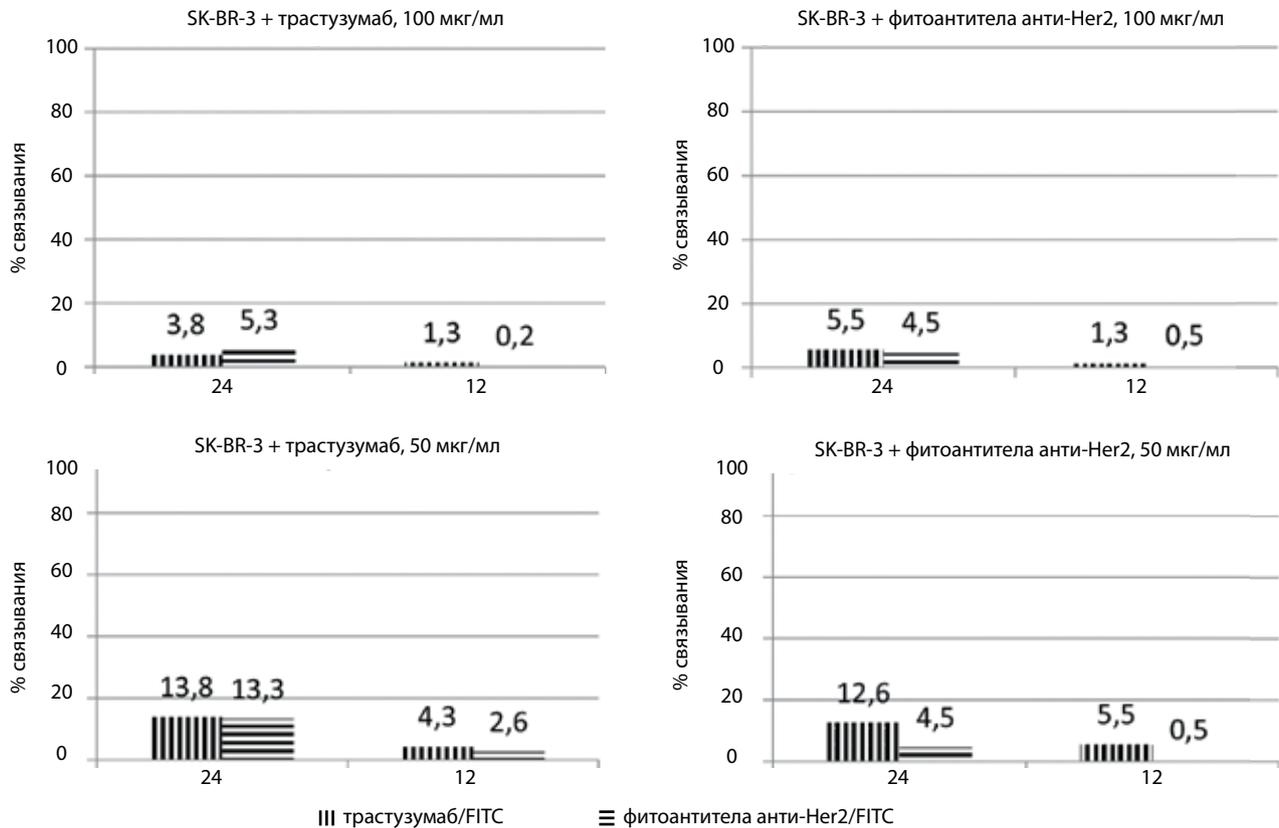


Рис. 4. Результаты эксперимента по определению конкурентного связывания рекомбинантных антител с клетками SK-BR-3 на проточном цитофлуориметре

miana. Для этого листья *N. benthamiana* инфицировали клетками *A. tumefaciens*, трансформированными соответствующими генными конструкциями. Эти конструкции обеспечивали экспрессию тяжелых и легких цепей рекомбинантного антитела анти-Her2 в клетках растения. После сбора растительного материала проводили экстракцию фитоантител анти-Her2 с последующей поэтапной очисткой.

Нами было проведено исследование с целью доказательства активности полученных анти-Her2 фитоантител, для этого использовали иммуноцитохимический тест. Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что полученные анти-Her2 фитоантитела способны специфически узнавать клетки РМЖ SK-BR-3 и связываться с ними.

Исследование специфической активности такого многофункционального вещества, как моноклональное антитело, можно проводить по нескольким параметрам. В первую очередь подлежит оценке эффективность связывания моноклональных антител с целевым антигеном Her2.

Полученные данные демонстрируют совпадение в аффинных свойствах trastuzumaba и фитоантител анти-Her2 как по степени связывания антигена, так и по локализации аффинного эпитопа на молекуле Her2. Метод проточной цитофлуориметрии позволяет оценить эти параметры на нативном антигене, локализованном на мембране клеток. Также была выявлена высокая степень связывания фитоантител анти-Her2 с рецепторами Her2 на поверхности клеток SK-BR-3, аналогичная связыванию контрольного препарата trastuzumaba.

Заключение

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что образцы фитоантител анти-Her2, полученных из растения *N. benthamiana*, связываются с тем же IV доменом онкоантигена Her2, что и trastuzumab, с аналогичной аффинностью. В связи с этим можно сделать вывод о том, что полученные фитоантитела анти-Her2 функционально соответствуют trastuzumabu.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Давыдов М.И. Структура заболеваемости злокачественными новообразованиями населения России в 2008 г. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2010;21(2):52.
2. Чиссов В.И. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность). М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2012. 260 с.
3. Hudziak R.M., Lewis G.D., Winget M. et al. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects *in vitro* and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 1989;3:1165–72. DOI: 10.1128/MCB.9.3.1165.
4. Komarova T.V., Kosorukov V.S., Frolova O.Y. et al. Plant-made trastuzumab (herceptin) inhibits HER2/Neu+ cell proliferation and retards tumor growth. *PLoS One* 2011:e17541. DOI: 10.1371/journal.pone.0017541.
5. Кособокова Е.Н., Пинюгина М.В., Косоруков В.С. Получение биологически активного интерферона- α -2b человека из растений *Nicotiana benthamiana*. *Биотехнология* 2015;4:52–61.
6. Stepkowski Z., Sun L.K., Shearman C.W. et al. Biological activity of human – mouse IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 chimeric monoclonal antibodies with antitumor specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(13):4852–6. PMID: 3387441.
7. Косоруков В.С., Скрыпник К.А., Трещалина Е.М., Андропова Н.В. Противоопухолевое действие субстанции рекомбинантных антител против онкоантигена HER2/neu, полученной из растительного продуцента. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(2):4.
8. Dorokhov Y.L., Frolova O.Y., Skurat E.V. et al. A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the enhancer of RNA silencing. *FEBS Lett* 2006;580:3872–8. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.06.013.
9. Komarova T.V., Sheshukova E.V., Kosobokova E.N. et al. Trastuzumab and pertuzumab plant biosimilars: Modification of Asn297-linked glycan of the mAbs produced in a plant with fucosyltransferase and xylosyltransferase gene knockouts. *Biochemistry (Moscow)* 2017;82(4):510–20. DOI: 10.1134/S0006297917040137.
10. Косоруков В.С., Кособокова Е.Н., Пинюгина М.В. и др. Биологическая активность рекомбинантных антител против рецептора Her2, полученных из растительного источника. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(2):105–12.