

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616-006-097:577.112.82:543.54

Ю.П. Финашутина¹, А.В. Мисюрин^{1,2}, Т.В. Ахлынина¹, Н.А. Лыжко¹, А.А. Крутов²,
Е.В. Аксенова², В.А. Мисюрин¹, А.Ю. Барышников¹

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНОГО БЕЛКА PRAME И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К НЕМУ¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, Москва²ООО «ГеноТехнология», Москва**Контактная информация**

Финашутина Юлия Павловна, научный сотрудник лаборатории рекомбинантных опухолевых антигенов НИИ ЭДнТО

адрес: 115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24; тел. +7(499) 612-80-38

e-mail: j_finashutina@mail.ru

Статья поступила 23.04.2015, принята к печати 10.06.2015.

Резюме

В последние годы среди опухолевых антигенов, распознаваемых цитотоксическими Т-лимфоцитами, найдено много перспективных объектов для создания противоопухолевых вакцин. Известно например, что антигены белка PRAME гиперэкспрессированы на поверхности опухолевых клеток различного гистологического происхождения, в том числе – при острых и хронических лейкозах. После инсерции вектора, сконструированного на базе κДНК гена PRAME, в бактерию можно синтезировать рекомбинантный белок PRAME. Нами были разработаны продуценты для экспрессии в виде телец включения полноразмерного белка PRAME и его N-концевой половины. Кроме того, отработан метод выделения, очистки в растворимой форме белка PRAME. Чистота полученного белка оценивается в 95–96%. N-концевая половина белка использовалась для наработки анти-PRAME антител, которые в дальнейшем использовали при вестерн-блоттинге различных линий опухолевых клеток. Данные антитела специфически распознавали нативный PRAME как в клеточных линиях, так и в образцах опухоли, полученных от онкологических больных. Наши данные подтверждают предположение, что рекомбинантный антиген может использоваться в качестве мишени для диагностических и терапевтических подходов. Полученные моноклональные антитела можно применять для иммуногистохимических исследований образцов опухолевых клеток онкогематологических больных и контролировать опухолевый рост.

Ключевые слова: рекомбинантный антиген, PRAME, аффинная хроматография, рефолдинг, моноклональные антитела.

Yu.P. Finashutina¹, A.V. Misyurin^{1,2}, T.V. Akhlynina¹, N.A. Lyzhko¹, A.A. Krutov²,
E.V. Aksenova², V.A. Misyurin¹, A.Yu. Baryshnikov¹

PRODUCTION OF PURIFIED HUMAN RECOMBINANT ANTIGEN PRAME AND SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES¹FSBI «N.N. Blokhin RCRC», Moscow²«GeneTechnology» LLC, Moscow**Abstract**

Tumor antigens recognized by CTLs have been identified several years ago and are major targets for creating anticancer vaccines. PRAME is an antigen which is highly expressed in various malignant tumors including melanomas and hematopoietic malignancies such as acute and chronic leukemias (AML, CML). Technology for producing recombinant antigen PRAME is based on creating a bacterial producer strain containing cDNA of human PRAME gene. We have obtained two producers of recombinant PRAME protein and its N-half, the synthesis of the target protein in the producers occurs in the inclusion bodies. The schemes of isolation and purification of soluble proteins have been developed. The protein purity was approximately 95–96%. The monoclonal antibodies raised against truncated recombinant PRAME were used for PRAME protein analysis by Western blot on the various tumor cells. Specific monoclonal antibodies recognized the native PRAME protein in tumor cell lines as well as in tumor samples from patients. Our findings support the suggestion that this recombinant antigen may be further used as a target for diagnostic and therapeutic approaches. The monoclonal antibodies can be used for immunoassays of tumor samples from patients with hematologic malignancies to reveal clinical features and to monitor tumor progression.

Key words: recombinant PRAME antigen, affine chromatography, refolding, monoclonal antibodies.

Введение

Значительный объем информации о распространенности и свойствах опухолеассоциированных антигенов человека, накопленный за последние десятилетия, создает предпосылку к проведению активной специфической иммунотерапии рака [1; 9–18; 23; 27; 30; 32; 37; 38]. Идентификация опухолевых антигенов, способных вызывать иммунный ответ у онкологических больных и разработка иммуногенных вакцин против рака на основе этих антигенов, представляет собой сложную и актуальную задачу [2–8; 19–22].

РТА обнаруживают только в немногих здоровых тканях (семенники, яичники, эндометрий), а также в ряде опухолевых тканей различного гистологического происхождения. Пептиды многих белков этого семейства презентуются на поверхности опухолевых клеток, стимулируя наработку антиген-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов, и этот факт делает их кандидатами для создания на их основе противоопухолевых вакцин. С использованием пептидов и рекомбинантных белков семейства РТА уже создан ряд вакцин, используемых в протоколах лечения меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака поджелудочной железы [34; 40; 47]. Вакцины на основе пептидов имеют ряд преимуществ, но не лишены недостатков: не являются универсальными, так как функционально связаны только с одним типом молекулы HLA; чистые пептиды слабо иммуногенны и могут стимулировать развитие иммунологической толерантности [25].

Антиген PRAME относится к семейству РТА и впервые был обнаружен в связи с тем, что пептиды этого белка распознавались цитотоксическими Т-лимфоцитами у больного меланомой [33]. PRAME также вызывает иммунный ответ у пациентов с хроническим миелоидным лейкозом, и острыми лимфоидными и миелоидными лейкозами [42; 43]. Экспрессия гена *PRAME* обнаруживается на низком уровне в тканях семенников и, на очень низком уровне, в яичниках, плаценте и почке [36]. Достаточно высокий уровень экспрессии *PRAME* показан для широкого спектра солидных опухолей и онкогематологических заболеваний [10; 27; 39; 44]. Т-клеточный иммунный ответ активируется также при вакцинации пациентов пептидами PRAME [24]. Вакцины на их основе проходят начальную фазу клинических испытаний для терапии рака простаты, почек, меланомы и хронического лимфолейкоза [45; 48].

Следует заметить, что белок PRAME в клетке локализован в различных компартментах, в том числе – во внешней мембране [41]. Белки, локализованные подобным образом, отличаются невысокой стабильностью растворимой формы. Для сохранения белка в удобной для проведения экспериментов форме требуется подбирать специальные условия очистки.

В настоящей работе мы получили очищенный рекомбинантный белок PRAME, наработанный

в системе гетерологической экспрессии в клетках *E. coli*, и оптимизировали условия для его очистки и рефолдинга. Белок может быть использован как антиген для противоопухолевой иммунотерапии.

Нами также получены МКА к антигену PRAME, которые можно применять для выявления экспрессии этого белка в опухолевых клетках. Использование этих антител дополнит предварительный отбор пациентов для иммунотерапии.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и клеточные линии

Использовались штаммы *E. coli* DH-5 α , BL21(DE3)pLyS и B834 (DE3)pLyS (Novagen, USA), а также линия эритромиелоидного лейкоза K562, линия меланомы Mel Hn и легочные фибробласты WI-38 человека.

Получение кодирующей последовательности гена PRAME

Копию гена *PRAME* и его фрагмента получали с помощью ПЦР.

В качестве матрицы для ПЦР использовали кДНК, полученную в результате реакции обратной транскрипции (ОТ) из тотальной РНК линии клеток K562.

Экспрессию гена в линиях клеток и клетках периферической крови пациентов определяли с помощью *real time* ПЦР.

Получение рекомбинантных плазмид

Для создания экспрессионных векторов фрагмент ДНК, очищенный после ПЦР, обработали ферментами рестрикции BamH I и NdeI (Fermentas, Литва) и вставили по сайтам рестрикции BamH I и NdeI в плазмиду pET-15b (Novagen, США). Полученный вектор назвали pPRAME-F.

Для создания экспрессионного вектора pPRAME-N с последовательностью гена *PRAME*, кодирующую N-половину белка, первый ПЦР-продукт размером 1548 п.н. клонировали в промежуточный вектор pGEM-T-Easy (Promega, США), получая вектор pG-PRAME. Затем этот вектор обрабатывали ферментами рестрикции BamH I и EcoRV.

Большой из получившихся 2 фрагментов обрабатывали ДНК-полимеразой «Фрагмент Кленова» (Sibenzyme, Россия), затем проводили реакцию лигирования, получая вектор pG-PRAME-N. Его, вектор, обработали эндонуклеазами рестрикции BamH I и NdeI и меньший из двух получившихся фрагментов вставили в плазмиду pET-15b, получая вектор pPRAME-N.

Кроме того, был создан вектор для экспрессии белка в эукариотических клетках. Для этого кодирующая последовательность гена PRAME была клонирована в плазмиду pCEP4 (Invitrogen, США). Трансфекцию фибробластов проводили согласно инструкции производителя TransFast Transfection Reagent (Promega, USA)

Экспрессия рекомбинантного белка PRAME и его фрагмента

Штаммы BL21(DE3)pLyS и B834 (DE3)pLyS были трансформированы плазмидами pPRAME-F и pPRAME-N. Трансформированные клетки высевали на чашку Петри с ампициллином (100 мкг/мл) и хлорамфениколом (34 мкг/мл) и инкубировали при +37 °С в течение ночи. Затем несколько колоний вносили в свежую среду SOB или TB и подращивали при +28 °С до плотности $OD_{600}=0,8$, после чего вносили ИПТГ для индукции синтеза белка. Растили 18 ч для синтеза PRAME-F или 2–3 часа для индукции синтеза PRAME-N при +28 °С. Центрифугировали культуру при 5 000 об/мин в течение 20 мин, осадок сохраняли. Наличие целевого белка подтверждали с помощью денатурирующего электрофореза в 10–15 %-ном полиакриламидном геле по стандартной методике [35].

Выделение и очистка белка PRAME и фрагмента

Осадок клеток ресуспендировали в буфере (50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 20 мМ ЭДТА). Клетки подвергали двукратному замораживанию – оттаиванию. После этого клетки подвергали ультразвуковой дезинтеграции (22 кГц, 3×10 с), добавляли рибонуклеазу до концентрации 2 ед./мл и дезоксирибонуклеазу до концентрации 300 000 ед./мл и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре.

Фрагменты разрушенных клеток осаждали центрифугированием (100 000 g, +4 °С, 1 ч). Далее проводили процедуру отмывки телец включения. Для этого осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 20 мМ трис-НСl, рН 8,0, 2 мМ ЭДТА, 0,05 М NaCl, 2 % Твин-20, и подвергали действию ультразвука, как описано выше, с последующим центрифугированием (10 000 об/мин, 5 мин). Процедуру отмывки телец включения повторяли. Полученный препарат телец включения гибридного белка был солюбилизирован в буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl, 50 мМ имидазола, 6 М гуанидинхлорид для культуры, трансформированной плазмидой pPRAME-F, или в буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl, 50 мМ имидазола, 8 М мочевины для культуры, трансформированной плазмидой pPRAME-N. Полученную суспензию центрифугировали 10 000 об/мин 5 мин, и супернатант использовали для дальнейшей очистки.

Далее проводили металл-хелатную аффинную хроматографию при умеренном давлении (FPLC, «Pharmacia», США) на колонке с Ni^{+2} агарозой (GE Healthcare, Великобритания). Для очистки белка PRAME-F колонку уравнивали буфером (10 мМ трис-НСl, 50 мМ имидазол, 6 М гуанидинхлорид), наносили препарат, промывали колонку тем же буфером, содержащим 2 % Твин-20, и проводили элюцию буфером (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 250 мМ имидазол, 6 М мочевины). Фракции анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Ренатурацию целевого белка проводили 10-кратным разведением в буфере, содержащем 10 % глицерина, 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 0,05 М NaCl, 0,1 мМ ТСЕР, 5 % N-лауроил саркозил при +4 °С с последовательным диализом препарата против аналогичного буфера. Затем белок концентрировали в ячейках Amicon-30 (Millipore, Германия), уменьшая объем препарата в 10 раз. Окончательный рефолдинг проводили с помощью диализа против буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl, рН 7,5; 0,07 % N-лауроил саркозила при 4 °С, затем диализ повторяли дважды против буфера, содержащего 150 мМ NaCl, 0,07 % N-лауроил саркозила при 4 °С. Состав буферов для рефолдинга белков подбирали с помощью наборов iFOLD Protein refolding System 1 и 2 (Novagen, США).

Для очистки белка PRAME-N колонку уравнивали буфером (10 мМ трис-НСl, 50 мМ имидазол, 8 М мочевины), наносили препарат, промывали колонку тем же буфером, содержащим 2 % Твин-20, и проводили элюцию буфером (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 300 мМ имидазол, 6 М мочевины). Содержащие целевой белок фракции объединяли и диализовали против буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl, рН 7,5; 0,07 % N-лауроил саркозила при +4 °С, затем диализ повторяли дважды против избытка буфера, содержащего 150 мМ NaCl; 0,07 % N-лауроил саркозила при +4 °С. Раствор, содержащий очищенные рекомбинантные белки, стерилизовали фильтрацией через фильтр 0,22 мкм.

Получение МКА к белку PRAME

Мышей линии Balb/c иммунизировали трехкратно с двухнедельными интервалами очищенным белком PRAME в дозе 50 мкг/мышь.

Слияние клеток селезенки мышей с миеломными клетками и последующее субклонирование гибридом проводили согласно стандартным методикам [31].

Последующий отбор гибридомных клонов проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа согласно стандартным методикам, используя белок PRAME в качестве антигена.

Дополнительный отбор гибридом, секретирующих антитела, проводили методом вестерн-блоттинга, используя линию клеток K562 с высоким уровнем экспрессии PRAME.

В дальнейшем МКА получали из асцитной жидкости мышей, имеющих в брюшной полости клетки соответственной гибридомы; при этом иммуноглобулиновую фракцию получали с помощью аффинной хроматографии на G-сефарозе (GE Healthcare, Великобритания). Изотип антител определяли с помощью набора для изотипирования иммуноглобулинов мыши (Sigma, США).

Иммуноблоттинг

Экспрессию белка определяли в лизатах клеточных линий K562, линии меланомы Mel Hn, фибробластах человека WI-38 и мононуклеарных клетках периферической крови. Лизаты готовили с помощью RIPA-буфера с ингибиторами протеаз

(Thermo Scientific Pierce, США). Электрофорез в 10 %-ном полиакриламидном геле проводили по стандартной методике Laemmli [35]. После электрофореза перенос белков из геля на Amersham Hybond-P PVDF мембрану (GE Healthcare, Великобритания) осуществляли методом полусухого электроблоттинга. В качестве первичных антител использовали полученные в данной работе МКА к белку PRAME; вторичных – антитела козы против антител мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Immune Jackson Research, США).

Для визуализации белка, связавшегося с антителами, использовали двухкомпонентную ECLTM Western Blotting систему (GE Healthcare, Великобритания). Цитоплазматическая фракция белков клеток меланомы и фракция, содержащая ядерные белки, получены с помощью набора для фракционирования клеток (BioVision, США).

Иммунизация животных рекомбинантными белками

Две группы по 20 мышей линии DBA/2 были трижды иммунизированы подкожно с двухнедельными интервалами очищенными белками PRAME-F и PRAME-N в дозе 100 мкг/мышь с 30 мкг гидроксида алюминия в качестве адьюванта. Титр антител в сыворотке оценивался методом твердофазного иммуноферментного анализа через 6 нед после первой иммунизации.

Результаты

Создание экспрессирующих конструкций

Для получения рекомбинантных белков созданы плазмидные конструкции на основе вектора pET-15b, содержащие кодирующие последовательности и последовательность для 6 гистидиновых аминокислотных остатков (6xHis-tag). Принципиальная схема плазмид представлена на рис. 1.

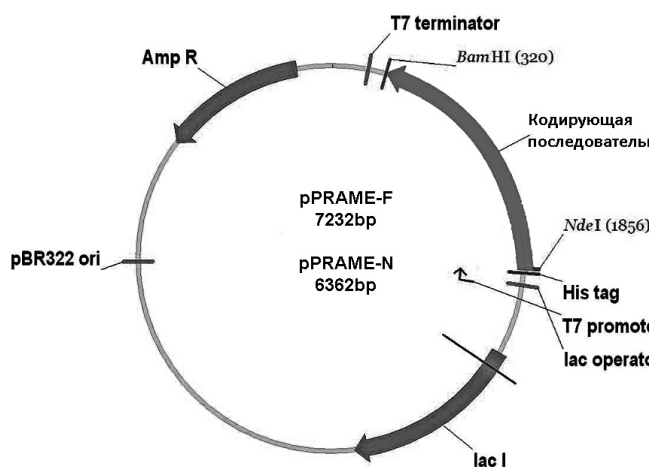


Рис.1. Схема векторов для экспрессии PRAME в бактериальной системе.

Все экспрессирующие конструкции охарактеризованы прямым секвенированием. Составные части плазмид и последовательности, кодирующие

белок PRAME полностью соответствуют оригинальной схеме конструирования плазмиды.

Полноразмерный ген PRAME (NM_006115.4) клонирован в вектор pET-15b для бактериальной экспрессии под индуцируемый T7-промотор и в вектор pCER4 для экспрессии в эукариотических клетках под контролем CMV-промотора. Подобным образом на основе вектора pET-15b сконструирована плаزمида для экспрессии N-половины белка PRAME.

Оптимизация процесса культивирования клеток штамма-продуцента рекомбинантных белков

Проведена оптимизация экспрессии рекомбинантных белков в клетках *E. coli*, при этом изменяли следующие параметры:

- штамм-продуцент (BL21(DE3)pLyS и B834 (DE3)pLyS),
- время индукции (2 ч и 18 ч),
- концентрацию ИПТГ и температуру культивирования бактерий (+28 °C; +37 °C).

Наилучший уровень экспрессии рекомбинантного белка достигнут в штамме BL21(DE3)pLyS на 18 – 20 ч после индукции 1 мМ ИПТГ при +28 °C для pPRAME-F и на 2–3 ч после индукции 0,5 мМ ИПТГ для pPRAME-N.

Оба рекомбинантных белка соответствовали ожидаемым размерам (60 и 30 кДа) и накапливались в нерастворимом состоянии.

Оптимизация процесса очистки рекомбинантных белков

Нерастворимые тельца включения предварительно отмывали буфером, содержащим Твин-20. Затем оба рекомбинантных белка очищали в денатурирующих условиях с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии.

Для солюбилизации белка PRAME-N использовали 6 М мочевины, рефолдинг очищенного белка проводили с помощью многократного диализа. Полноразмерный белок PRAME-F при аналогичной методике после диализа выпадал в осадок, и для него условия рефолдинга подбирали, изменяя состав буфера, pH и метод ренатурации.

В итоге были подобраны условия, включающие 10-кратное разведение буфером на основе соли триса при pH 8,0, содержащим N-лауроилсаркозин. При этих условиях рефолдинга рекомбинантный белок PRAME-F оставался растворимым в достаточной для дальнейших нужд концентрации.

Уровень продукции целевого белка в штамме *E. coli*, трансформированном плазмидами pPRAME-F и pPRAME-N, составлял соответственно 12 мг и 15 мг на 1 л. исходной культуры.

Чистота рекомбинантных белков оценивалась по электрофореграмме с помощью программы Phoretix 1D Advanced v.5.10 и составляла 96 и 94 % соответственно. Примеры экспрессии и очистки белка приведены на рис. 2.

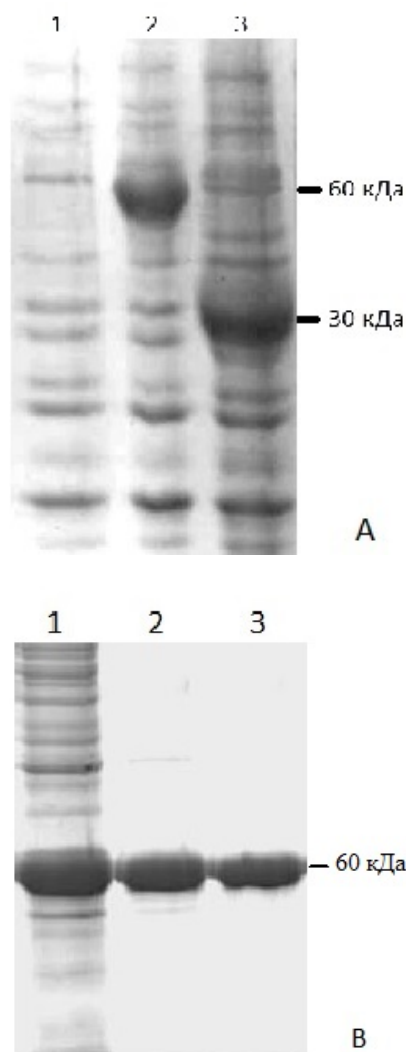


Рис. 2. Экспрессия и очистка рекомбинантных белков:

- A. 1 – клетки *E. coli* без индукции экспрессии; 2; 3 – клетки *E. coli*, экспрессирующие белки PRAME-F и PRAME-N соответственно.
 B. 1 – предварительно отмытые тельца включения; 2; 3 – очищенный полноразмерный рекомбинантный белок PRAME.

Получение МКА к белку PRAME

При иммунизации мышей белком rPRAME-N получены 9 гибридных линий, секретирующих анти-PRAME антитела. Из них отобраны две пробы культуральных супернатантов, которые специфически узнавали белок в клеточных лизатах, что и доказано с помощью иммуноблоттинга. Проведено изотипирование МКА, согласно которому один клон принадлежит к подклассу IgG1, а другой – к IgG2a. Полученные МКА специфически распознавали очищенный рекомбинантный белок PRAME, а также белок, экспрессирующийся в различных культурах клеток.

Экспрессия белка

в нормальных и опухолевых клетках

Для детекции белка в клетках с помощью полученных антител использованы клеточные линии с высоким уровнем экспрессии гена (K562, Mel

Hn), а также линия легочных фибробластов в качестве отрицательного контроля (исходно ген *PRAME* не экспрессируется). В фибробластах инициирована экспрессия гена *PRAME* с помощью введения в них вектора для экспрессии генов в эукариотических культурах.

Специфический сигнал на иммуноблоте, соответствующий белку с молекулярным весом 60 кДа, обнаружен только в лизатах клеток с высоким уровнем экспрессии гена *PRAME* при использовании каждого МКА (рис. 3).

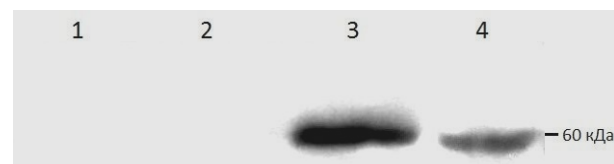


Рис. 3. Иммуноблот клеточных лизатов, окрашенный МКА к PRAME H8:

- 1 – фибробласты WI38;
 2 – фибробласты WI38, трансфицированные контрольным вектором pCER4;
 3 – фибробласты WI38, трансфицированные вектором pCER4-PRAME;
 4 – линия клеток K562.

Кроме того, антиген PRAME обнаруживался как в ядерной, так и в цитоплазматической фракции клеток меланомы Mel Hn (рис. 4). По литературным данным локализация белка может быть ядерной и цитоплазматической [41; 46].

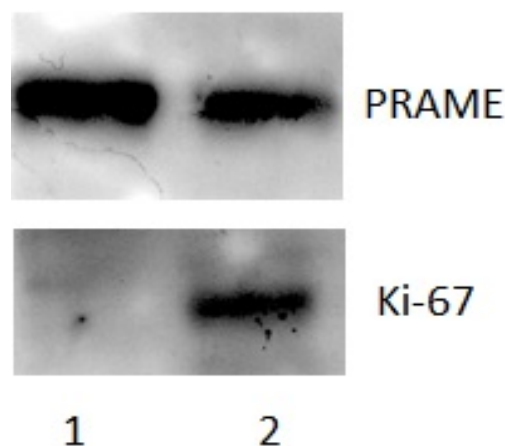


Рис. 4. Иммуноблот линии меланомы Mel Hn, окрашенный МКА к PRAME H8 и антителами к ядерному белку Ki-67:

- 1 – цитоплазматическая фракция клеток;
 2 – ядерная и мембранная фракции клеток.

Кроме того, с помощью МКА исследованы клетки периферической крови онкогематологических пациентов (ХМЛ и ММ). В этом случае также наблюдалось соответствие результатов с данными по экспрессии гена. Для пациентов и здоровых доноров, отрицательных по экспрессии гена, не обнаруживался сигнал на иммуноблоте и наоборот (рис. 5).

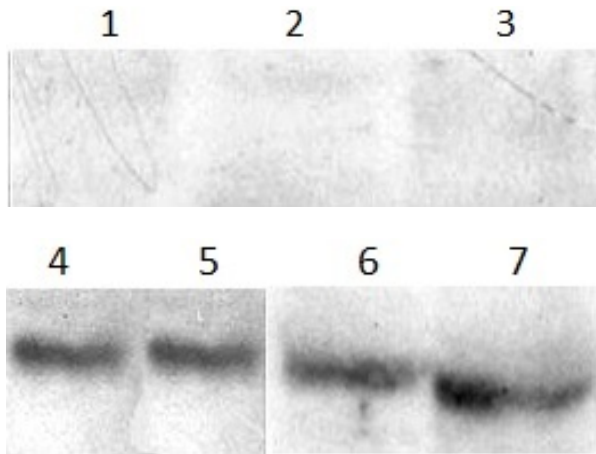


Рис. 5. Пример иммуноблота клеток пациентов, окрашенный МКА к PRAME:

- 1 – здоровый донор;
- 2; 3 – клетки пациента с ХМЛ (хроническая фаза);
- 4; 5 – ХМЛ, бластный криз;
- 6; 7 – множественная миелома.

Развитие гуморального ответа на рекомбинантные белки PRAME-F и PRAME-N

Методом непрямого твердофазного ИФА были измерены титры специфических антител сыворотках мышей к полученным рекомбинантным белкам. Каждым белком было проиммунизировано 10 мышей. Для белка PRAME-F максимальный титр достигал 1 : 102 400, а для белка PRAME-N – 1 : 51 200, из чего можно сделать вывод: белок достаточно иммуногенен.

Таким образом, в данной работе были получены рекомбинантный полноразмерный антиген PRAME человека и антиген, соответствующий N-половине целого белка PRAME.

Оптимизированы условия экспрессии и очистки этих белков, в результате чего последние в растворимой форме пригодны для иммунизации и получения антител.

Литература

1. *Абраменко И.В., Белоус Н.И., Крячок И.А. и др.* Экспрессия гена PRAME при миеломной болезни // Терапевтический архив. – 2004. – Т. 76, № 7. – С. 77–81.
2. *Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Соколова З.А., Косоруков В.С.* Разработка липосомальной конструкции, содержащей лизат опухолевых клеток // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 5.
3. *Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Щербаков А.И. и др.* Разработка модели противоопухолевой липосомальной вакцины // Иммунология. – 2014. – № 6. – С. 317–21.
4. *Барышников А.Ю.* Взаимодействие опухоли и иммунной системы организма // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 127–30.
5. *Барышников А.Ю.* Принципы и практика вакцинотерапии рака // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2004. – № 2. – С. 59–63.
6. *Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Кадагидзе З.Г. и др.* Современные проблемы биотерапии злокачественных опухолей // Вестник Московского онкологического общества. – 2008. – № 1. – С. 6–10.
7. *Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Михайлова И.Н., Петенко Н.Н.* Вакцинотерапия рака: от эксперимента к клинике // Вестник Московского Онкологического Общества. – 2007. – № 10. – С. 46–8.
8. *Барышникова М.А., Барышников А.Ю.* Молекулярные механизмы преодоления множественной лекарственной устойчивости липосомальными противоопухолевыми препаратами // Российский био-

С помощью одного из белков нами получены МКА к белку PRAME, специфически распознающие нативный белок в культурах опухолевых клеток и клетках онкогематологических больных.

Кроме того, на основании наших результатов можно предположить, что белок и/или его фрагменты расположены как в ядре клетки, так и в цитоплазме.

Это согласуется с данными литературы по исследованию локализации белка PRAME [41; 46]. Антитела, распознающие опухолевые антигены, в том числе PRAME, широко применяют в научных и клинических исследованиях [16; 26].

Однако антитела к белку PRAME, используемые в зарубежных работах – антитела поликлональные, полученные к олигопептиду [28; 46].

В некоторых работах антитела производили к 22 кДа части белка [41], однако такие антитела распознавали белок необычного размера в иммуноблотах.

Заключение

В своей работе мы получили два МКА к рекомбинантной N-половине белка PRAME. Из наблюдений по связыванию МКА с эпитопами PRAME на живых клетках мы предположили, что они обладают специфичностью к разным эпитопам белка. Это дает более широкие возможности для использования антител для исследований. Поскольку полученные белки продемонстрировали свою иммуногенность, мы считаем целесообразным продолжить исследование полученных рекомбинантных белков PRAME как антигенов для противоопухолевой иммунотерапии. При проведении экспериментов рекомендуем придерживаться условий, изложенных выше.

Работа поддержана международным фондом INTAS (Ref.Nr. 03-55-1739)

- терапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 3–10.
9. Гапонова Т.В., Менделеева Л.П., Мисюрин А.В. и др. Экспрессия опухолеассоциированных генов PRAME, WT1 и XIAP у больных множественной миеломой // Онкогематология. – 2009. – № 2. – С. 52–7.
 10. Мисюрин А.В., Абраменко И.В., Белоус Н.И. и др. Экспрессия гена PRAME при множественной миеломе // Онкология. – 2004. – Т. 2. – С. 90–4.
 11. Мисюрин В.А. Аутосомные раково-тестикулярные гены // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 77–82.
 12. Мисюрин В.А. X-хромосомные раково-тестикулярные гены // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 3–10.
 13. Мисюрин В.А., Лукина А.Е., Кесаева Л.А. и др. Различия в частоте развития рецидива острого промиелоцитарного лейкоза в зависимости от уровня экспрессии PRAME // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59, № S1. – С. 51.
 14. Мисюрин В.А., Лукина А.Е., Мисюрин А.В. и др. Особенности соотношения уровней экспрессии генов PRAME и PML/RARA в дебюте острого промиелоцитарного лейкоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 9–16.
 15. Мисюрин В.А., Мисюрин А.В., Кесаева Л.А. и др. Изменение профиля экспрессии канцер-тестис антигенов в крови при прогрессии хронического миелоидного лейкоза // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59, № S1. – С. 52.
 16. Мисюрин В.А., Мисюрин А.В., Кесаева Л.А. и др. Новые маркеры прогрессирования хронического миелолейкоза // Клиническая онкогематология. – 2014. – Т. 7, № 2. – С. 206–12.
 17. Мисюрин В.А., Мисюрин А.В., Кесаева Л.А. и др. Сходство профилей экспрессии раково-тестикулярных генов при хронических миелолипролиферативных заболеваниях и хроническом миелоидном лейкозе // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59, № S1. – С. 51–2.
 18. Мисюрин В.А., Мисюрин А.В., Лукина А.Е. и др. Профили экспрессии раково-тестикулярных генов в клеточных линиях меланомы // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2014. – Т. 31, № 2. – С. 104–9.
 19. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Клименко О.В. и др. Разработка липосомальной формы противоопухолевой вакцины // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 62–6.
 20. Никитин К.Д., Барышников А.Ю. Противоопухолевые вакцины на основе белков теплового шока // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 3–12.
 21. Новиков В.В., Евсегнеева И.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы при социально значимых инфекциях // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 100–5.
 22. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. и др. Особенности структурного состояния пула растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы // Молекулярная медицина. – 2009. – № 4. – С. 27–33.
 23. Aksenova E., Krutov A., Misiurin A. et al. Correlation between PRAME, WT1 and BCR-ABL expression and response to the therapy at CML // Haematologica. – 2010. – 95(S2). – P. 529.
 24. Babiak A., Steinhauser M., Götz M. et al. Frequent T-cell responses against immunogenic targets in lung cancer patients for targeted immunotherapy // Oncol Rep. – 2014. – 31(1). – P. 384–90.
 25. Vocchia M., Bronte V., Colombo M.P. Antitumor vaccination: where we stand // Haematologica. – 2000. – 85(11). – P. 1172–206.
 26. Brenne K., Nymoer D.A., Reich R. PRAME (preferentially expressed antigen of melanoma) is a novel marker for differentiating serous carcinoma from malignant mesothelioma // Am J Clin Pathol. – 2012. – 137(2). – P. 240–7.
 27. Epping M.T., Hart A.A., Glas A.M. et al. PRAME expression and clinical outcome of breast cancer // Br J Cancer. – 2008. – 99. – P. 398–403.
 28. Epping M.T., Wang L., Edel M.J. et al. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling // Cell. – 2005. – 122. – P. 835–47.
 29. Finashutina Y., Akhlynina T., Zhelnova E. et al. Anti-tumor vaccination in combination with modified donor lymphocyte infusion for an AML resistant patient with early extramedullary relapses // Haematologica. – 2013. – 98(1). – P. 517–8.
 30. Finashutina Yu.P., Aksenova E.V., Misyurin A.V. et al. PRAME expression in chronic myeloid leukemia // Haematologica. – 2007. – 92(1). – P. 376.
 31. Galfrè G., Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures // Methods Enzymol. – 1981. – 73. – P. 3–46.
 32. Gaponova T., Mendeleeva L.P., Misiurin A. et al. Expression of tumor-associated genes in multiple myeloma patients during high-dose chemotherapy and auto-SCT // Cellular Therapy and Transplantation. – 2009. – 2(5). – P. 62–3.
 33. Ikeda H., Lethé B., Lehmann F. et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor // Immunity. – 1997. – 6. – P. 199–208.

34. *Kruit W.H., van Ojik H.H., Brichard V.G. et al.* Phase 1/2 study of subcutaneous and intradermal immunization with a recombinant MAGE-3 protein in patients with detectable metastatic melanoma // *Int J Cancer*. – 2005. – 117(4). – P. 596–604.
35. *Laemmli U.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – 224. – P. 680–5.
36. *Luetkens T., Schafhausen P., Uhlich F. et al.* Expression, epigenetic regulation, and humoral immunogenicity of cancer-testis antigens in chronic myeloid leukemia // *Leukemia Research*. – 2010. – 34. – P. 1647–55.
37. *Lyzhko N.A., Akhlynina T.V., Misiurin A.V. et al.* Expression and localization of the PRAME protein in the different cell cultures // 17th EHA Congress. – 2012. – Abstract 1356.
38. *Misurin A., Gaponova T., Mendeleeva L. et al.* Expression of PRAME and WT1 in multiple myeloma patients during high dose chemotherapy and auto-SCT // *Blood*. – 2008. – 112(11). – P. 5128.
39. *Oberthuer A., Hero B., Spitz R. et al.* The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome // *Clin Cancer Res*. – 2004. – 10. – P. 4307–13.
40. *Okuyama R., Aruga A., Hatori T. et al.* Immunological responses to a multi-peptide vaccine targeting cancer-testis antigens and VEGFRs in advanced pancreatic cancer patients // *Oncoimmunology*. – 2013. – 2(11). – e27010.
41. *Proto-Siqueira R., Figueiredo-Pontes L.L., Panepucci R.A. et al.* PRAME is a membrane and cytoplasmic protein aberrantly expressed in chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma // *Leukaemia Res*. – 2006. – 30. – P. 1333–9.
42. *Quintarelli C., Dotti G., De Angelis B. et al.* Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia // *Blood*. – 2008. – 112. – P. 1876–85.
43. *Rezvani K., Yong A.S., Tawab A. et al.* Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8+ T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia // *Blood*. – 2009. – 113. – P. 2245–55.
44. *Steinbach D., Hermann J., Viehmann S. et al.* Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia // *Cancer Genet Cytogenet*. – 2002. – 133. – P. 118–23.
45. *Tabarkiewicz J., Giannopoulos K.* Definition of a target for immunotherapy and results of the first Peptide vaccination study in chronic lymphocytic leukemia // *Transplant Proc*. – 2010. – 42(8). – P. 3293–6.
46. *Tajeddine N., Gala J.L., Louis M. et al.* Tumor-associated antigen preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) induces caspase-independent cell death in vitro and reduces tumorigenicity in vivo // *Cancer Res*. – 2005. – 65. – P. 7348–55.
47. *Vansteenkiste J., Zielinski M., Linder A. et al.* Final results of a multi-center, double-blind, randomized, placebo-controlled phase II study to assess the efficacy of MAGE-A3 immunotherapeutic as adjuvant therapy in stage IB/II non-small cell lung cancer (NSCLC) // *J Clin Oncol*. – 2007. – 25(18S). – P. 7554.
48. *Weber J.S., Vogelzang N.J., Ernstoff M.S. et al.* A phase 1 study of a vaccine targeting preferentially expressed antigen in melanoma and prostate-specific membrane antigen in patients with advanced solid tumors // *J Immunother*. – 2011. – 34(7). – P. 556–67.