



УДК 577.112.083:571.27

НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ И ХИМЕРНЫЕ АНТИТЕЛА К ИНТЕРФЕРОНУ- γ ЧЕЛОВЕКА

© 2015 г. М. В. Ларина*,*, Т. К. Алиев*, О. Н. Солопова**, Л. П. Позднякова***,
С. В. Коробова****, С. А. Якимов*, П. Г. Свешников***,
Д. А. Долгих*,****, М. П. Кирпичников*,****

*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва

***Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва

****ФГБУ «ГНЦ Институт Иммунологии» ФМБА России, Москва

*****МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва

Поступила в редакцию 12.08.2014. Принята к печати 01.11.2014 г.

Аутоиммунные заболевания — это хронические заболевания, при которых иммунный ответ направлен на собственные антигены организма, что приводит к повреждению тканей и нарушению их нормального функционирования. Нередко эти заболевания приводят к инвалидности и смерти пациентов. На сегодняшний день для направленной терапии аутоиммунных заболеваний успешно применяется ряд моноклональных антител к провоспалительным цитокинам и их рецепторам. Одной из перспективных мишеней для лечения аутоиммунных заболеваний является интерферон- γ (IFN- γ), цитокин, играющий ключевую роль в дифференцировке Th1-клеток, активации макрофагов и воспалении. В работе был получен набор из 5 моноклональных антител (мАТ) к IFN- γ человека. Для получения прототипа терапевтического препарата исследованы аффинность полученных антител к IFN- γ и их способность к блокированию индуцированной IFN- γ активности. На основании полученных данных для химеризации было выбрано мАТ F1, комплекс которого с IFN- γ характеризуется константой диссоциации 1.7 нМ; кроме того, это антитело проявило низкое значение IC₉₀ (8.9 ± 2.0 нМ) при ингибировании индуцируемой IFN- γ экспрессии антигена HLA-DR на поверхности клеток линии U937. Был сконструирован бицистронный вектор для продукции Fab-фрагмента химерного антитела F1 chim в клетках *E. coli*. Полученный рекомбинантный Fab-фрагмент химерного антитела F1 нейтрализует IFN- γ -индуцируемую активность *in vitro* и его комплекс с IFN- γ характеризуется константой диссоциации 1.8 нМ.

Ключевые слова: интерферон- γ , терапевтические моноклональные антитела, рекомбинантные антитела.

DOI: 10.7868/S0132342315030057

Аутоиммунные заболевания поражают около 5% населения в мире и характеризуются высокой частотой летальных исходов [1]. Это хронические заболевания неизвестной этиологии, которые обу-

Сокращения: мАТ — моноклональные антитела; FITC — Fluorescein isothiocyanate; HLA-DR — человеческий лейкоцитарный антиген DR (Human Leukocyte Antigen DR); IC₉₀ и IC₅₀ — концентрация 90%-го и 50%-го ингибирования; IDA-сефароза — сефароза, активированная иминодиацильными группами; IFN- γ — интерферон- γ ; IPTG — изопропил- β -D-тиогактопиранозид; SOE-ПЦР — Splicing by Overlap Extension PCR (ПЦР с перекрывающимися областями); PBS — забуференный физиологический раствор; TMB — 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; PMSF — фенилметилсульфонилфторид; Th — Т-хелперные клетки; Treg — регуляторные Т-клетки; TNF — фактор некроза опухолей.

Автор для связи (тел.: +7 (495) 330-66-38, эл. почта: marya.larina@gmail.com).

словлены комбинацией различных факторов: генетической предрасположенностью, факторами внешней среды и нарушениями работы иммунной системы. Предполагается, что сбой механизмов, контролирующих иммунную толерантность, обуславливает узнавание собственных антигенов аутореактивными лимфоцитами, что приводит к повреждению тканей. Общими чертами различных аутоиммунных заболеваний являются дефекты в активации лимфоцитов и механизмах врожденного иммунитета, постоянная инфильтрация органов, подверженных атаке лейкоцитами и лимфоцитами, повышенная продукция цитокинов и секреция аутоантител [2, 3].

Использование биопрепаратов показало, что блокирование провоспалительных цитокинов, та-

ких, как TNF- α и IL-6, может предотвращать прогрессирование заболевания при ревматоидном артрите и ряде других аутоиммунных заболеваний [3]. Одним из провоспалительных цитокинов, рассматриваемым как перспективная мишень для терапии аутоиммунных заболеваний, является IFN- γ , один из самых важных медиаторов иммунного ответа и воспаления. Этот цитокин играет ключевую роль в активации макрофагов, воспалении, защите организма от внутриклеточных патогенов, в Th1-ответе [4]. Наряду с этим IFN- γ выполняет регуляторные функции, ограничивая повреждение тканей, связанное с воспалением, и влияет на дифференцировку Th- и Treg-клеток. Для ряда заболеваний показана способность IFN- γ усиливать или подавлять (в зависимости от стадии развития патологического процесса) аутоиммунные процессы и связанные с ними патологии [5].

Эффективным способом селективного подавления биологической активности IFN- γ для терапевтических целей является использование специфичных к нему моноклональных антител (мАТ). Одним из первых примеров использования антител к IFN- γ в терапии стали клинические испытания гуманизированного антитела фонтोलизумаб для лечения болезни Крона, которые впоследствии были приостановлены на 2-й фазе ввиду недостаточной эффективности [6]. Вместе с тем было показано, что использование поликлональных антител, специфичных к IFN- γ при таких заболеваниях, как псориаз, ревматоидный артрит, витилиго, вторично-прогрессирующий рассеянный склероз, имеет выраженный терапевтический эффект [7].

Моноклональные антитела, полученные с помощью иммунизации животных, чаще всего мышей, обладают высокой иммуногенностью при введении в организм человека, особенно повторно, что приводит к уменьшению времени полувыведения и снижению эффективности лечения, вызывает ряд нежелательных реакций [8, 9]. Кроме того, в организме человека мышинные мАТ, эффекторные функции которых реализуются по клеточноопосредованному механизму, не способны проявлять терапевтический эффект [10]. Эти недостатки мышинных мАТ препятствуют их использованию в качестве терапевтических препаратов для человека. Для снижения иммуногенности терапевтических мАТ широко применяются такие подходы, как химеризация и гуманизация (замена последовательностей каркасных участков переменных доменов мышинных мАТ на соответствующие последовательности человека) [11]. Другим направлением в разработке терапевтических мАТ является получение полностью человеческих мАТ из комбинаторных библиотек с использованием метода фагового дисплея, или ис-

Таблица 1. Аффинность моноклональных антител к IFN- γ и их изотипическая принадлежность

мАТ	$K_d \times 10^8$, М	Тяжелая цепь	Легкая цепь
F1	0.17	IgG1	к
A4	6.3	IgG1	к
D4	1.3	IgG1	к
A1	3.5	IgG2a	к
C1	3.9	IgG1	к

пользование трансгенных животных (например, использование технологии Xenomouse) [11, 12].

Целью настоящей работы было получение химерных моноклональных антител против IFN- γ человека для создания на их основе терапевтического препарата для лечения воспалительных аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, псориаз и другие.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование мышинных мАТ для получения на их основе прототипа терапевтического препарата для человека предполагает выполнение ряда этапов, начиная от иммунизации животных до структурного и физико-химического анализа свойств выбранного антитела. Важным этапом на пути к терапевтическому использованию мышинных мАТ является проведение их химеризации и оценка ее влияния на свойства родительского мАТ.

Для получения гибридом, продуцирующих мАТ к человеческому IFN- γ , использовали клетки миеломы SP2/0 и лимфоциты мышей линии BALB/c, иммунизированных комплексом из рекомбинантного человеческого IFN- γ и антитела к нему. Для первичной характеристики полученных мАТ было проведено их изотипирование с помощью прямого иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием диагностических антител против различных субизотипов антител мыши и определение аффинности к IFN- γ человека. Полученные гибридомы продуцировали антитела класса IgG, 4 клон антитела подкласса IgG1 и один клон подкласса IgG2a (табл. 1). Образцы антител получали из асцитной жидкости мышей, образовавшейся в результате прививки животным клеток соответствующих гибридом (табл. 1). Значения констант диссоциации комплексов полученных мАТ с IFN- γ находятся в диапазоне от 3.9×10^{-8} до 1.7×10^{-9} М (табл. 1). Сравнение констант диссоциации показывает, что

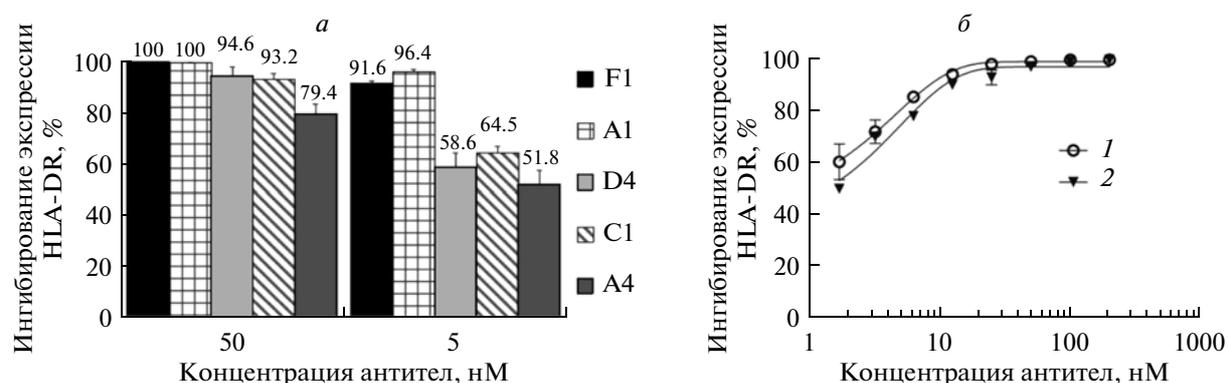


Рис. 1. Ингибирование индуцированной IFN- γ экспрессии антигена HLA-DR на поверхности клеток U937. (а) – сравнение нейтрализующей активности пяти мАТ против IFN- γ при концентрациях IFN- γ 5 и 50 нМ. (б) – сравнение нейтрализующей активности мАТ F1 (1) и мАТ A1 (2) в интервале концентраций от 1.7 до 200 нМ.

из пяти исследуемых мАТ наибольшей аффинностью по отношению к IFN- γ человека обладает антитело F1.

На следующем этапе нейтрализующую биологическую активность антител определяли по их способности ингибировать экспрессию молекул человеческого лейкоцитарного антигена DR (HLA-DR) на поверхности клеток линии U937, индуцируемую IFN- γ . Результаты эксперимента показали, что все исследуемые мАТ обладают специфической нейтрализующей активностью по отношению к IFN- γ (рис. 1а), при этом два антитела из пяти, F1 и A1, нейтрализуют человеческий IFN- γ с максимальной эффективностью. Исследование нейтрализующей активности антител F1 и A1 в более широком интервале концентраций, от 1.5 до 200 нМ (рис. 1б), показало, что выбранные антитела характеризуются значениями IC₅₀ для мАТ F1 и A1 8.9 ± 2.0 и 13.5 ± 2.4 нМ соответственно.

Результаты определения биологической активности антител в широком интервале концентраций, а также данные о константах диссоциации комплекса антитела с IFN- γ позволили выбрать мАТ F1 для получения на его основе химерного аналога. Химеризация представляет собой замену константных доменов мАТ мыши на соответствующие домены человека, что позволяет снизить иммуногенность получаемых антител за счет отсутствия иммунного ответа на Fc-фрагмент антитела мыши.

Как правило, моноклональные антитела, применяемые в терапии человека, представляют собой полноразмерные иммуноглобулины, которые синтезируются в основном в клетках млекопитающих. Данный способ экспрессии позволяет получить функционально активный белок с большим количеством правильно замкнутых дисульфидных связей и необходимым гликозилированием. Несмотря на то, что продукция полнораз-

мерных иммуноглобулинов в микроорганизмах в настоящее время остается практически невозможной, экспрессия в клетках *E. coli* позволяет получать функционально активные Fab-фрагменты антител в сравнительно короткие сроки и с небольшими затратами. Продукция Fab-фрагментов антител в бактериальных клетках является удобным методом скрининга антител – кандидатов для получения прототипа терапевтического препарата.

Для получения химерного рекомбинантного антитела F1 chim на первом этапе были выделены фрагменты ДНК, кодирующие переменные домены легкой и тяжелой цепей мАТ F1. Для этого из клеток гибридомы F1 выделяли суммарную РНК, проводили обратную транскрипцию, а затем с помощью олигонуклеотидов к нуклеотидным последовательностям, кодирующим константные домены антител (табл. 2) методом ПЦР получали фрагменты ДНК, кодирующие переменные области легкой и тяжелой цепей мАТ F1 (рис. 2).

Полученные фрагменты клонировали во вспомогательный вектор pAL-TA, после чего проводили их секвенирование. Сравнение нуклеотидных последовательностей с последовательностями ближайших гомологов в базе данных IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) подтвердило их принадлежность к генам иммуноглобулинов *Mus musculus* (рис. 3). Правильность определения первичной структуры переменных доменов антитела F1 подтверждали времяпролетной масс-спектрометрией с ионизацией MALDI. Анализ молекулярной массы пептидных продуктов триптического протеолиза исследуемого мАТ F1 подтвердил соответствие аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей полученным нами нуклеотидным последовательностям генов антитела (рис. 3).

Таблица 2. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Тип амплификации	Название	Нуклеотидная последовательность, 5'–3'
Обратная транскрипция	RT	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTA(T) ₃₀
	SMRibo	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG-TACGC(rG)(rG)(rG)
Амплификация легкой и тяжелой цепи, универсальный 5'-праймер	SM	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
Амплификация VL	RT-Кар	GTTCAAGAAGCACACGACTGA
Амплификация VH	NesG	CAGGGGCCAGTGGATAGAC
Амплификация VL для последующей химеризации	F1-L-Nde2	GACATATGCAGACATTGTGATGTCACAG
	226himLF	CTGGAAATCAAACGGACTGTGGCTGCA
Амплификация Ск для последующей химеризации	226himLR	TGCAGCCACAGTCCGTTTGATTTCCAG
	TerL	CTTCCGGATCCCTTATTAACACTCTCCCCTG
Амплификация VH для последующей химеризации	F1-H-Nde	TACATATGCCACAGGTTTCAGCTGCAGCAGT
	C1-himH-R	GACCGATGGGGCCCTTGGCTGAGGAGACG
Амплификация C _{H1} для последующей химеризации	C1-himH-F	CGTCTCCTCAGCCAAGGGCCCATCGGTC
	XhoG1	CCACCTCGAGAAATTTTCTTGTCCACCTTGG

Подчеркиванием отмечены сайты узнавания рестриктаз. Сокращения для обозначения нуклеотидных последовательностей, кодирующих: VL – варибельный домен легкой цепи антитела, VH – варибельный домен тяжелой цепи антитела, Ск – константный домен легкой каппа-цепи человека, C_{H1} – первый константный домен тяжелой цепи антитела IgG1 человека.

Таким образом, для получения рекомбинантных Fab-фрагментов химерного мАТ F1 на основе вектора рТс99а был сконструирован экспрессионный вектор рF1-chim (рис. 4). Фрагменты VL и VH объединяли с константным доменом C_к легкой

цепи и первым константным доменом C_{H1} тяжелой цепи IgG1 человека соответственно с помощью ПЦР с перекрывающимися областями (SOE-ПЦР) (рис. 2). Полученные фрагменты клонировали в вектор рТс99а в виде бицистрона. Для секреции це-

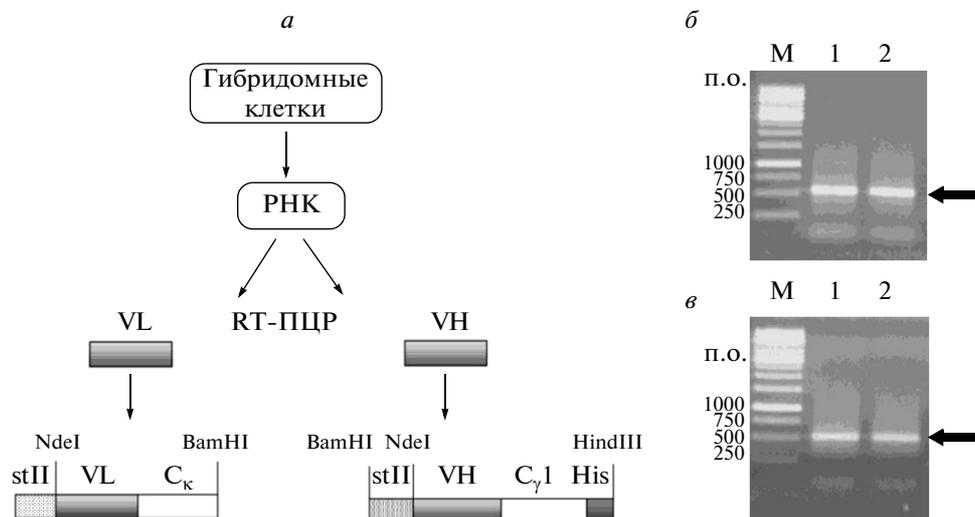


Рис. 2. Схема выделения фрагментов ДНК, кодирующих варибельные области легкой и тяжелой цепей мАТ F1, и получения генов Fab-фрагмента химерного антитела F1 chim для экспрессии в клетках *E. coli*. (а) – Амплификация фрагмента ДНК, кодирующего варибельный домен легкой цепи мАТ F1. (б) – М – маркер молекулярных масс, 1, 2 – продукты амплификации фрагмента ДНК, кодирующего варибельную область легкой цепи с праймером RT-Кар. Амплификация фрагмента ДНК, кодирующего варибельный домен тяжелой цепи мАТ F1. (в) – М – маркер молекулярных масс, 1, 2 – продукты амплификации фрагмента ДНК, кодирующего варибельную область тяжелой цепи с праймером NesG.

		<i>a</i>				<i>b</i>				
		FR1	CDRH1	FR2	CDRH2	FR1	CDRL1	FR2	CDRL2	
F1	1 10 20 30 40 50 a 60	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFS	SYWIE	WIKQRPGHGLEWIG	EILPGNTNTNYNEKFKG					
MALDI		XXXXXXXXXX	XXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX					
		FR3		CDRH3	FR4					
F1	70 80 abc 90 abcde 110	KATFTADTTSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR		GADYGGDYAMDY	WGQGTSVTVSS					
MALDI		XXXXXXXXXXXXXXXXXX		XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX					
		<i>b</i>								
		FR1	CDRL1	FR2	CDRL2					
F1	1 10 20 abcdef 30 40 50	DIVMSQSPSSLAVS IGEKVTMSC	KSSQSLLYSSNQKNYLA	WYQQKPGQSPKLLIY	WASTRES					
MALDI		XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXX					
		60 70 80 90 100								
F1	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSMKAEDLAVYYC	QQYYSYPYT	FGGGTKLEIK							
MALDI	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXX							

Рис. 3. Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой (*a*) и легкой (*b*) цепей мАТ F1. Серым цветом и знаком "X" отмечены аминокислотные остатки соответствующих пептидов, обнаруженных при анализе продуктов триптического гидролиза мАТ F1 методом время-пролетной масс-спектрометрии с ионизацией MALDI. Гипервариабельные участки (CDR) и каркасные области (FR) отмечены в соответствии с номенклатурой Kabat [28].

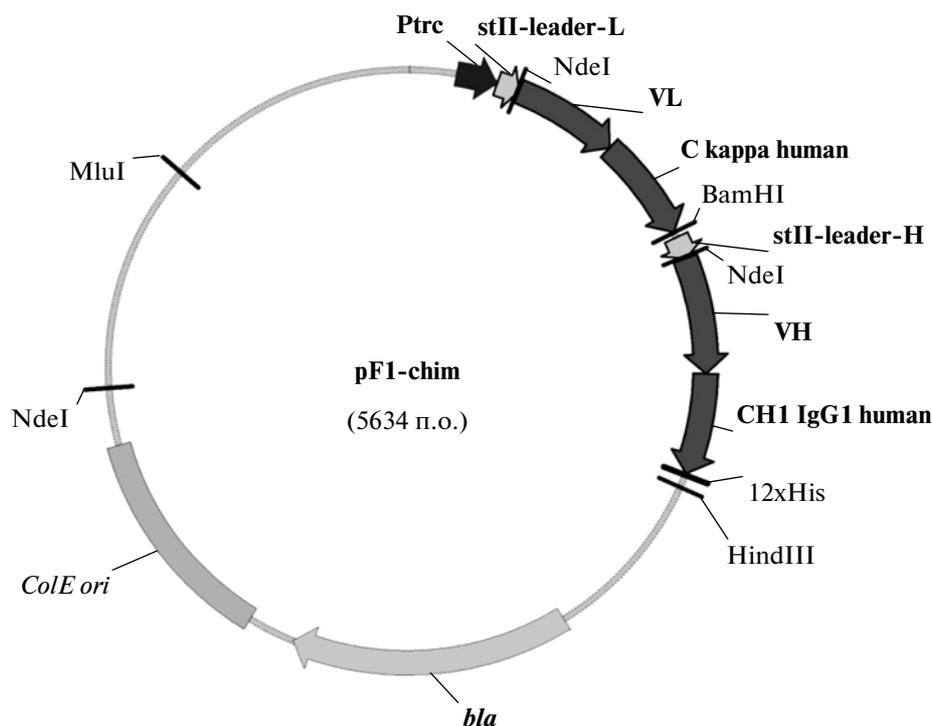


Рис. 4. Схема бицистронного вектора pF1-chim для экспрессии рекомбинантного Fab-фрагмента химерного антитела F1 chim; VL – переменный домен легкой цепи мАТ F1; VH – переменный домен тяжелой цепи мАТ F1; C kappa human – константный домен легкой κ -цепи человека; CH1 IgG1 human – первый константный домен тяжелой цепи IgG1 человека; stII-leader – лидерный пептид stII термостабильного энтеротоксина II *E. coli*; bla – ген, кодирующий β -лактамазу.

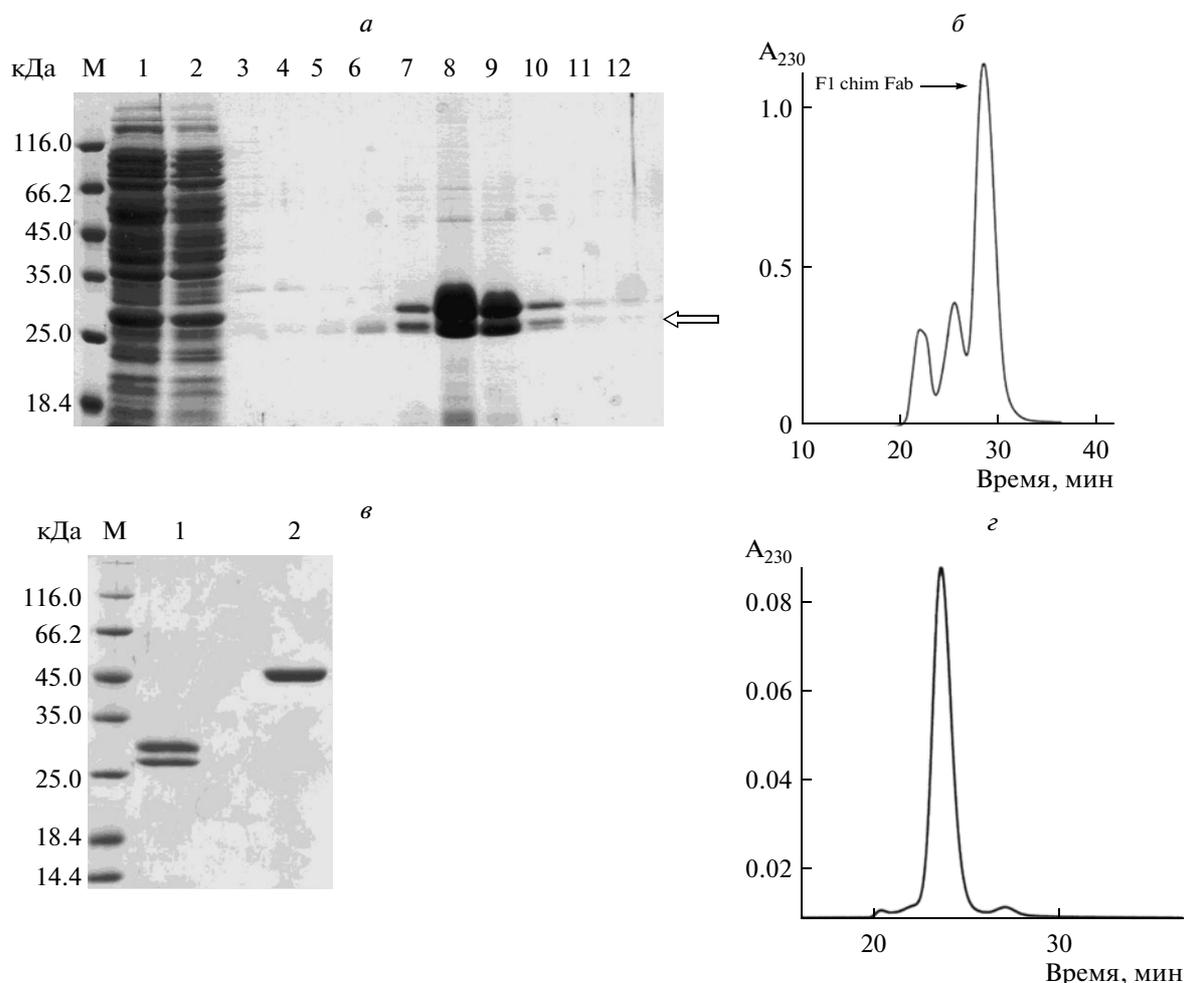


Рис. 5. Выделение и очистка Fab-фрагмента химерного антитела F1 chim. (а) – электрофорез в 12.5% SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях фракций, полученных при металл-аффинной хроматографии. М – маркеры молекулярных масс; 1, 2 – промывка колонки PBS, 3, 4 – промывка буфером PBS, содержащим 10 мМ имидазол; 5–12 – элюция Fab-фрагмента буфером PBS, содержащим 300 мМ имидазол. Стрелкой отмечен целевой белок. (б) – Гель-фильтрационная хроматография. (в) – Электрофорез в 12.5% SDS-ПААГ очищенного Fab-фрагмента химерного антитела F1 chim в восстанавливающих (1) и невосстанавливающих (2) условиях. (г) – Аналитическая гель-фильтрационная хроматография очищенного Fab-фрагмента химерного антитела F1 chim.

левого белка в культуральную среду на 5'-концах нуклеотидных последовательностей, кодирующих легкую и тяжелую цепь F1 chim, была помещена последовательность, кодирующая лидерный пептид stII термостабильного энтеротоксина II *E. coli*.

Экспрессия рекомбинантных антител, содержащих большое количество дисульфидных связей, в восстанавливающих условиях в цитоплазме клеток приводит к образованию нефункциональных агрегатов [14]. Ключевым моментом для первого примера успешного получения функционального фрагмента антитела в *E. coli*, описанного А. Скерра и А. Плюхтуном в 1988 г. [15], была транслокация обеих цепей антитела в периплазматическое пространство *E. coli*, где окислительная

среда позволяла осуществить правильное формирование дисульфидных связей и сборку функционального Fv-фрагмента антитела. Эта стратегия также позволила впервые получить функциональный Fab-фрагмент антитела в *E. coli* [16]. На сегодняшний день для обеспечения транслокации синтезируемых цепей фрагментов антител используют несколько лидерных пептидов: *ompA*, *PhoA*, *PelB* (для периплазматической экспрессии) [17–19] и *stII* (для секреторной экспрессии) [20, 21].

Для продукции целевого белка в клетках штамма BL21(DE3) *E. coli* был использован метод автоиндукции, позволяющий достичь достаточно высоких плотностей культуры при выращивании и не использовать IPTG для индукции *lac*-промото-

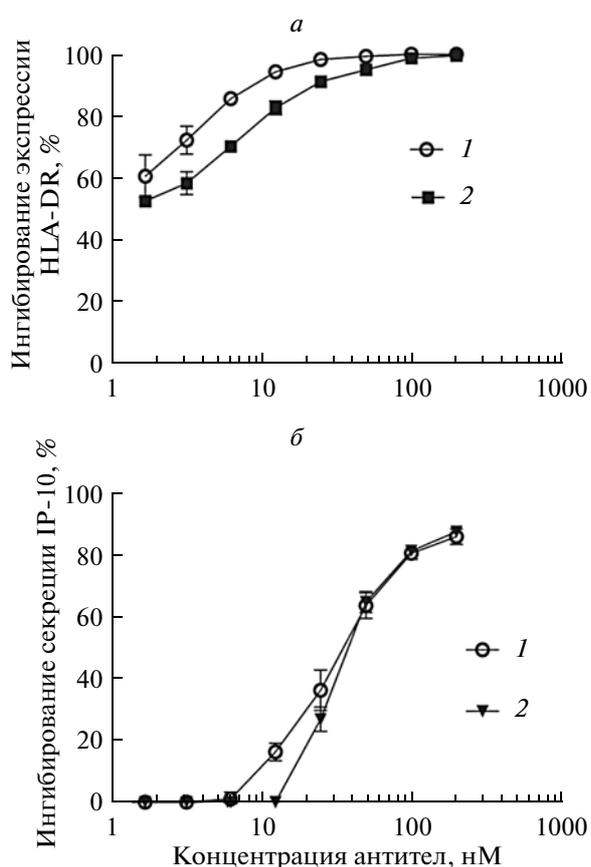


Рис. 6. Нейтрализующая IFN- γ активность Fab-фрагмента химерного антитела F1 chim. *а* – ингибирование индуцированной IFN- γ экспрессии антигена HLA-DR на поверхности клеток U937. *1* – полноразмерное мАТ F1, *2* – рекомбинантный Fab-фрагмент химерного антитела F1 chim. *б* – ингибирование индуцированной IFN- γ секреции хемокина IP-10 в клетках HT29. *1* – Fab-фрагмент мышиного мАТ F1, полученный с помощью гидролиза папаином, *2* – рекомбинантный Fab-фрагмент химерного антитела F1 chim.

ра. В результате выход целевого белка после очистки с помощью металлоаффинной и гель-фильтрационной хроматографий составил 0.8–1 мг с литра культуральной жидкости (рис. 5а, 5б). Чистота полученного рекомбинантного Fab-фрагмента F1 chim по данным аналитической гель-хроматографии и электрофореза в ПААГ составила не менее 98% (рис. 5в, 5г).

Определение равновесной константы диссоциации комплекса полученного Fab-фрагмента с IFN- γ с помощью конкурентного ИФА показало, что аффинность к IFN- γ рекомбинантного химерного мАТ F1 chim ($K_d = 1.8 \times 10^{-9}$ М) практически не отличается от аффинности к этому цитокину родительского мышиного мАТ.

Нейтрализующую активность полученного рекомбинантного химерного антитела проверяли, индуцируя экспрессию молекул HLA-DR на поверхности клеток U937 (рис. 6а). Полученное в результате значение IC_{90} для F1 chim Fab составило 27.1 ± 1.1 нМ, в то время как значение IC_{90} для мАТ F1 – только 8.7 ± 1.1 нМ. Мы предположили, что к изменению нейтрализующей активности антитела могла привести не только замена константной области антитела на человеческую, но и моновалентный характер связывания Fab-фрагмента с антигеном в отличие от двух антигенсвязывающих центров полноразмерного антитела.

В следующем эксперименте для исследования влияния химеризации на нейтрализующую активность антитела мы использовали в качестве контроля не родительское мАТ, а его Fab-фрагмент, полученный с помощью ограниченного гидролиза папаином. Исследуемые фрагменты антител добавляли к клеткам линии HT29, в которых с помощью IFN- γ была индуцирована секреция хемокина IP-10. Результаты эксперимента показали, что как рекомбинантный Fab-фрагмент химерного антитела F1 chim, так и Fab-фрагмент мышиного мАТ специфически блокировали IFN- γ со значениями IC_{50} 41.4 ± 1.0 и 37.2 ± 1.0 нМ соответственно (рис. 6б). Полученный результат подтверждает сохранение биологической активности после химеризации антитела и свидетельствует о том, что наблюдавшиеся различия в значениях IC_{90} мАТ F1 и полученного химерного Fab-фрагмента вызваны разным количеством антигенсвязывающих центров белков.

Таким образом, анализ полученной панели мАТ против IFN- γ позволил провести отбор наиболее эффективного антитела F1. Сконструированный на его основе рекомбинантный Fab-фрагмент химерного антитела связывается с IFN- γ и нейтрализует его биологическую активность так же эффективно, как и родительское мАТ. Химерный аналог F1 chim может быть использован в дальнейшем для создания на его основе гуманизированного рекомбинантного антитела, содержащего меньшую долю мышиных аминокислотных последовательностей и, следовательно, имеющего меньшую иммуногенность для человека, что имеет большое значение при создании терапевтического препарата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: рекомбинантный человеческий IFN- γ (PeproTech, США), рекомбинантный человеческий IFN- γ (Prospec, Израиль), Trizol Reagent, среду DMEM, среду RPMI 1640, эмбриональную телячью сыворотку (FCS), L-глута-

мин, раствор пенициллин-стрептомицин-фунги-зон (Anti-anti), раствор гипоксантин-аминоптерин-тимидин (НАТ) – (Life Sciences, США), пластик для культивирования клеток (Greiner Bio One, США), планшеты для ИФА (Corning Costar, США), планшеты для ИФА Nunc Maxisorp (Thermo Scientific, США), однокомпонентный субстрат тетраметил-бензидин (ТМВ) (НПО “БиотестСистемы”, Россия), протеин-G-сефарозу, хелатирующую сефарозу Fast flow IDA-сефароза (GE-Healthcare, США), обратную транскриптазу MMuLV, эндонуклеазы рестрикции (Fermentas, Литва), ДНК-полимеразу Tersus, вектор pALTA – (Евроген, Россия), DMSO (Sigma), набор для ИФА BD OptEIA™ Human IP-10 ELISA Set (BD Biosciences, США), моноклональные антитела к HLA-DR, меченные FITC (Сорбент, Россия), бактоагар, дрожжевой экстракт, триптон (BD, Франция), штаммы *E. coli* XL1 Blue (a,b 3 recA1 endA1 gyrA96 thi_1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proABlacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]) (Stratagene, США) и BL21(DE3), (F– ompT gal dcm lon hsdSB λ (DE3 [lacI lacUV5_T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])) (Novagen, США). МАТ НЗ-1 было любезно предоставлено С. Ф. Авериним (Институт инженерной иммунологии (г. Любучаны, Московская область, Россия)). Для определения изотипов МАТ использовали Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Sigma, США). Остальные химические реактивы были получены из коммерческих источников и использованы без предварительной очистки.

Получение гибридом. Для иммунизации мышей использовали рекомбинантный IFN-γ человека (PerproTech, США). Самок мышей линии BALB/c (2.5 мес, 20–22 г) иммунизировали IFN-γ в комплексе с МАТ НЗ-1. Для формирования эквивалентного иммунного комплекса смешивали 25 мкг IFN-γ со 110 мкг антител в 150 мкл PBS. Полученный раствор смешивали с равным объемом полного адьюванта Фрейнда до образования устойчивой эмульсии. Повторную иммунизацию проводили спустя 2 недели той же дозой иммуногена, заменяя полный адьювант Фрейнда на неполный. На 4-й день после второй иммунизации проводили гибридизацию клеток подколенных лимфоузлов с клетками миеломы SP2/0 по стандартной методике [22] с использованием ПЭГ 4000. Титр сывотки в день гибридизации составил 1 : 125000.

Очищенные МАТ получали из асцитной жидкости аффинной хроматографией на протеин-А-сефарозе, как описано ранее [23].

Определение равновесной константы диссоциации комплекса МАТ с рекомбинантным IFN-γ человека. Аффинность антител определяли по методу Клотца с помощью конкурентного твердофазного

ИФА [24]. Константу диссоциации вычисляли по формуле $A_0/(A_0 - A) = 1 + 1/a \cdot K_d$, где

A_0 – оптическое поглощение, раствора антитела в отсутствие антигена,

A – оптическое поглощение раствора свободных антител в смеси антиген-антитело,

a – концентрация антигена, М.

Концентрацию антител для измерения K_d выбирали на линейном участке калибровочной кривой.

Получение генов переменных доменов антитела F1. Из $1-2 \times 10^6$ клеток гибридом выделяли суммарную РНК с помощью реагента Trizol согласно рекомендуемому производителем протоколу. С помощью реакции обратной транскрипции, используя праймер dT₁₈, была синтезирована первая цепь кДНК согласно методу, описанному в работе [25]. Реакционную смесь разбавляли в 80 раз и амплифицировали кДНК, которая затем была использована в качестве матрицы для получения переменных участков генов легкой и тяжелой цепей антитела. Легкую цепь амплифицировали с праймером на κ-цепь RTКар и праймером S1, комплементарным участку, встроенному на 5'-конец кДНК на предыдущем этапе, тяжелую цепь амплифицировали с праймером к константному домену γ1-цепи человека NesG и праймером S1 (табл. 2). Полученные фрагменты длиной около 300 п.о. были клонированы во вспомогательный вектор pALTA (Eurogen), после чего с помощью секвенирования были установлены нуклеотидные последовательности, кодирующие переменные фрагменты МАТ F1.

Создание экспрессионного вектора и продукция рекомбинантного Fab-фрагмента антитела F1 chim. Фрагменты ДНК, кодирующие переменные домены легкой и тяжелой цепей МАТ F1 были получены с помощью ПЦР (с использованием пар праймеров F1-L-Nde2/226L-R и F1-H-Nde/C1-himH-R), после чего были объединены методом SOE-PCR с константным C_κ-доменом легкой цепи человека и первым константным доменом C_{H1} тяжелой цепи IgG1 человека; соответственно. Для получения гена химерной легкой цепи были использованы концевые праймеры F1-L-Nde2 и TerL, комплементарные 5'-концу области VL и 3'-концу константного домена каппа-цепи человека (табл. 2). Для получения гена химерной тяжелой цепи антитела F1 были использованы праймеры F1H-Nde и G1-Xho, комплементарные 5'-концу области VH и 3'-концу константного домена C_{H1} цепи IgG1 человека. Все концевые праймеры содержали сайты узнавания рестриционных эндонуклеаз, необходимые для дальнейшего клонирования. Полученные фрагменты легкой и тяжелой цепей клонировали в вектор

pTc99a после последовательностей лидерного пептида stII по сайтам рестрикции NdeI/VamHI и NdeI/XhoI соответственно.

Полученные нуклеотидные последовательности были клонированы в модифицированный вектор pTc 99a (Pharmacia). Полученным экспрессионным вектором pF1-chim трансформировали клетки *E. coli* штамма BL-21 (DE-3). Для продукции рекомбинантного Fab-фрагмента химерного антитела F1 chim использовали метод автоиндукции, для чего клетки BL-21 (DE-3), трансформированные вектором pF1-chim, выращивали в течение 22–24 ч при температуре 30°C в питательной среде 2ZY, содержащей 2 mM MgSO₄, 25 mM Na₂HPO₄, 25 mM KH₂PO₄, 50 mM NH₄Cl, 5 mM Na₂SO₄, 0.5% глицерина, 0.05% глюкозы, 0.2% моногидрата α-лактозы и 100 мкг/мл ампицилина [26]. Оптическая плотность культуры к моменту завершения инкубации достигала 7 OЕ₆₀₀.

Очистка рекомбинантного Fab-фрагмента антитела F1 chim. После завершения инкубации клетки осаждали центрифугированием, культуральную жидкость, содержащую целевой белок, концентрировали методом тангенциальной фильтрации через мембрану с нижней границей удержания 30 кДа (Millipore) и проводили диализ против К-фосфатного буфера pH 8.0 (47 mM K₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄, 500 mM KCl, 0.001% PMSF). Рекомбинантный Fab-фрагмент очищали на хелатирующей IDA-сефарозе. Для подготовки носителя перед аффинной хроматографией 1 мл IDA-сефарозы помещали в колонку, промывали 10 мл деионизованной воды и 3 мл 0.2 М раствора CoCl₂, затем 10 мл деионизованной воды и уравнивали 5 мл К-фосфатного буфера pH 8.0, используемым для диализа. После этого носитель смешивали с концентрированным и диализованным супернатантом и инкубировали при перемешивании при 4°C в течение ночи и помещали в колонку. Белок элюировали PBS pH 7.4, содержащим 300 mM имидазола. Наличие и чистоту целевого белка во фракциях анализировали с помощью электрофореза в восстанавливающих условиях в 12.5% ПААГ по методу Лэммли [27]. Фракции, содержащие целевой белок соответствующей молекулярной массы (2 фрагмента, приблизительно по 25 кДа каждый) объединяли и концентрировали с помощью концентратора Amicon Ultra (Millipore) с нижней границей удержания 30 кДа и наносили на колонку Superdex 75-10/300-GL (GE Healthcare) в 100 mM Трис-НСl буфере (pH 8.0) с 150 mM NaCl. Фракцию, выходящую на 29-й мин, собирали, концентрировали и диализовали против PBS (pH 7.4). Концентрацию целевого белка определяли спектрофотометрически (принимая, что A₂₈₀, равная 1.7, соответствует концентрации белка 1 мг/мл) с

помощью спектрофотометра Nanodrop (Thermo Scientific, США).

Клеточные линии и условия культивирования. В работе использовали клетки макрофагально-моноцитарной линии U937 и клетки аденокарциномы кишечника человека HT29. Клетки линии U937 культивировали в среде RPMI 1640 (Gibco), содержащей 10% FCS, 2 mM L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл фунгизона (Gibco). Клетки HT29 культивировали в среде DMEM (Gibco), содержащей 10% FCS, 2 mM L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл фунгизона.

Определение нейтрализующей активности антител

Ингибирование индукции экспрессии молекул HLA-DR на поверхности клеток U937. Экспрессию антигена HLA-DR на клетках моноцитарно-макрофагальной линии U937 индуцировали как было описано ранее [28]. Вкратце: 2 × 10⁵ клеток инкубировали в течение 24 ч при 37°C в среде, содержащей 0.02 мкг/мл IFN-γ (Prospec, Israel). МАТ и Fab-фрагменты МАТ добавляли к клеткам в диапазоне концентраций от 200 до 1.7 нМ. В качестве контроля использовали клетки, которые инкубировали в присутствии рекомбинантного IFN-γ без добавления МАТ и клетки без добавления IFN-γ и МАТ. После инкубации определяли экспрессию молекул HLA-DR на поверхности клеток методом проточной цитометрии, предварительно окрашивая клетки МАТ к HLA-DR, меченными FITC. Клеточную суспензию инкубировали с антителами в рабочем разведении (30 мин, 4°C), по окончании инкубации клетки 2 раза отмывали буфером PBS от несвязавшихся антител. Уровень экспрессии молекул HLA-DR определяли на проточном цитофлуориметре BD Canto II (BD Biosciences, USA). Для обработки данных использовали программное обеспечение FACSDiva. В каждом образце регистрировали не менее 1 × 10⁴ клеток. Процент ингибирования рассчитывали по следующей формуле: $(1 - X / X_0) \times 100$, где X – доля HLA-DR-положительных клеток в образце, X₀ – доля HLA-DR-положительных клеток в положительном контроле (клетки U937, индуцированные IFN-γ в отсутствие антител). Все значения использовали для расчетов за вычетом отрицательного контроля (доля HLA-DR-положительных клеток в образцах без добавления IFN-γ и антител).

Ингибирование индукции синтеза IP-10 в клетках HT29. Синтез хемокина IP-10 в клетках HT29 индуцировали, добавляя рекомбинантный IFN-γ (Peprotech, США) до конечной концентрации

10 ед./мл. Клетки помещали в 96-луночный планшет (1×10^4 клеток/луночка) и оставляли для прикрепления на ночь. Затем среду заменяли на свежую, содержащую 10 ед./мл IFN- γ и исследуемые антитела в различных концентрациях (от 1.7 до 200 нМ). Клетки инкубировали в течение 24 ч при 37°C в атмосфере, содержащей 8% CO₂. Через 24 ч культуральную жидкость отбирали и замораживали до проведения непрямого ИФА. Концентрацию IP-10 в среде определяли с помощью непрямого ИФА с использованием набора BD OptEIA™ Human IP-10 ELISA Set (BD Biosciences, США). Непрямой ИФА осуществляли согласно рекомендациям производителя. Процент ингибирования рассчитывали по формуле: $(1 - A/A_0) \times 100\%$, где A и A_0 — оптическое поглощение образца и положительного контроля, представляющего собой клетки HT29, индуцированные IFN- γ в отсутствие антител. Все значения оптического поглощения измеряли при длине волны 450 нм и использовали для расчетов за вычетом отрицательного контроля (значение A_{450} в образцах без добавления IFN- γ и антител).

Fab-фрагмент мышинового МАТ F1 получали методом протеолитического гидролиза полноразмерных МАТ папаином. Проведение реакции и очистки гидролизата осуществляли по методу [29].

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке субсидии (Соглашение № 14.607.21.0060), выделяемой Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goodnow C.C., Sprent J., Fazekas de St Groth B., Vinuesa C.G. // *Nature*. 2005. V. 425. P. 590–597.
2. Kuchroo V.K., Ohashi P.S., Sartor R.B., Vinuesa C.G. // *Nature Medicine*. 2012. V. 18. P. 42–47.
3. Balague C., Kunkel S.L., Godessart N. // *Drug Discovery Today*. 2009. V. 14. P. 926–934.
4. Billiau A., Matthys P. // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2009. V. 20. P. 97–113.
5. Hu X., Ivashkiv L.B. // *Immunity*. 2009. V. 31. P. 539–550.
6. Reinisch W., de Villiers W., Bene L., Simon L., Rácz I., Katz S., Altorjay I., Feagan B., Riff D., Bernstein C.N., Hommes D., Rutgeerts P., Cortot A., Gaspari M., Cheng M., Pearce T., Sands B.E. // *Inflamm. Bowel Dis.* 2010. V. 16. P. 233–242.
7. Skurkovich S., Skurkovich B. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005. V. 1051. P. 684–700.
8. Sgro C. // *Toxicology*. 1995. V. 105. P. 23–29.
9. Yamashita M., Katakura Y., Shirahata S. // *Cytotechnology*. 2007. V. 55. P. 55–60.
10. Ober R.J., Radu C.G., Ghetie V., Ward E.S. // *Int. Immunol.* 2001. V. 13. P. 1551–1559.
11. Деев С.М., Лебедеенко Е.Н. // *Acta Naturae*. 2009. № 1. С. 32–50.
12. Jakobovits A., Amado R.G., Yang X., Roskos L., Schwab G. // *Nature Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 1134–1143.
13. Kabat E.A., Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S., Foeller C. // *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., NIH Publication 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. P. 103–511.
14. Schmidt F.R. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. V. 65. P. 363–372.
15. Skerra A., Pluckthun A. // *Science*. 1988. V. 240. P. 1038–1041.
16. Better M., Chang C.P., Robinson R.R., Horwitz A.H. // *Science*. 1988. V. 240. P. 1041–1043.
17. Ge L., Knappik A., Pack P., Freund C., Pluckthun A. *Antibody Engineering*. Ed. Borrebaeck, C.A.K. New York; Oxford University Press, 1995.
18. Sletta H., Tondervik A., Hakvag S., Aune T.E., Nedal A., Aune R., Evensen G., Valla S., Ellingsen T.E., Brautaset T. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 906–912.
19. Rusch S.L., Kendall D.A. // *Biochemistry*. 2007. V. 46. P. 9665–9673.
20. Lauer B., Otteleben I., Jacobsen H.J., Reinard T. // *J. Agric. Food Chem.* 2005. V. 53. P. 899–904.
21. Mi J., Yan J., Guo Z., Zhao M., Chang W. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 383. P. 218–223.
22. Kohler G., Milstein C. // *Nature*. 1975. V. 256. P. 495–497.
23. Калиниченко А.А., Топорова В.А., Панина А.А., Алиев Т.К., Крюкова Е.А., Шемчукова О.Б., Солопова О.Н., Позднякова Л.П., Свешников П.Г., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. // *Биоорг. химия*. 2010. Т. 36. С. 122–132. [Kalinichenko A.A., Toporova V.A., Panina A.A., Aliev T.K., Kryukova E.A., Shemchukova O.B., Solopova O.N., Pozdnyakova L.P., Sveshnikov P.G., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2010. V. 36. P. 122–132.]
24. Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E. // *J. Immunol. Meth.* 1985. V. 77. P. 305–319.
25. Chenchik A., Zhu Y.Y., Diatchenko L., Li R., Hill J., Siebert P.D. // *BioTechniques Books*, MA., 1998. P. 305–319.
26. Studier F.W. // *Prot. Expr. Purif.* 2006. V. 41. P. 207–234.
27. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
28. Gao J., Folghera S., Fiorentini S., Tinti M., Varinacci C., Flamminio G., Peroni L., Caruso A. // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 1993. V. 7. P. 115–120.
29. Adamczyk M., Gebler J.C., Wu J. // *J. Immunol. Meth.* 2000. V. 237. P. 95–104.

Neutralizing Monoclonal and Chimeric Antibodies to Human IFN- γ

M. V. Larina*.,#, T. K. Aliev**, O. N. Solopova***, L. P. Pozdnyakova***, S. V. Korobova****, S. A. Yakimov*, P. G. Sveshnikov***, D. A. Dolgikh*, *****, M. P. Kirpichnikov*, *****

Phone: +7 (495) 330-66-38, e-mail: marya.larina@gmail.com

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

** *Chemistry Department, Moscow State University, Moscow*

*** *Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy, Moscow*

**** *Institute of Immunology, Moscow*

***** *Biology Department, Moscow State University, Moscow*

Autoimmune disorders are chronic diseases characterized by abnormal immune response directed against self-antigens that leads to tissue damage and violation of its normal functioning. Such diseases often result in disability or even death of patients. Nowadays a number of monoclonal antibodies to pro-inflammatory cytokines and their receptors are successfully used for the targeted treatment of autoimmune diseases. One of the perspective targets in autoimmune disease therapy is interferon gamma, a key cytokine in Th1 cells differentiation, activation of macrophages, and inflammation. In the present work, 5 monoclonal antibodies to human IFN- γ were obtained. For the development of potential therapeutic agent, we have performed neutralizing activity and affinity analysis of the antibodies. Based on the data obtained, the monoclonal antibody F1 was selected. This antibody has a dissociation constant 1.7×10^{-9} M and $IC_{90} = 8.9 \pm 2.0$ nM measured upon antibody inhibition of the IFN- γ -induced HLA-DR expression on the surface of U937 cells. We have constructed a bicistronic vector for the production of recombinant chimeric Fab fragment F1 chim in *E. coli* cells. The recombinant chimeric Fab fragment F1 chim neutralizes IFN- γ activity in vitro and has a dissociation constant 1.8×10^{-9} M.

Keywords: IFN- γ , therapeutic monoclonal antibodies, recombinant antibodies