

# Прикладные аспекты иммунологии

## Инженерия антител

к.х.н., доцент кафедры  
микробиологии  
Герловский Денис Олегович

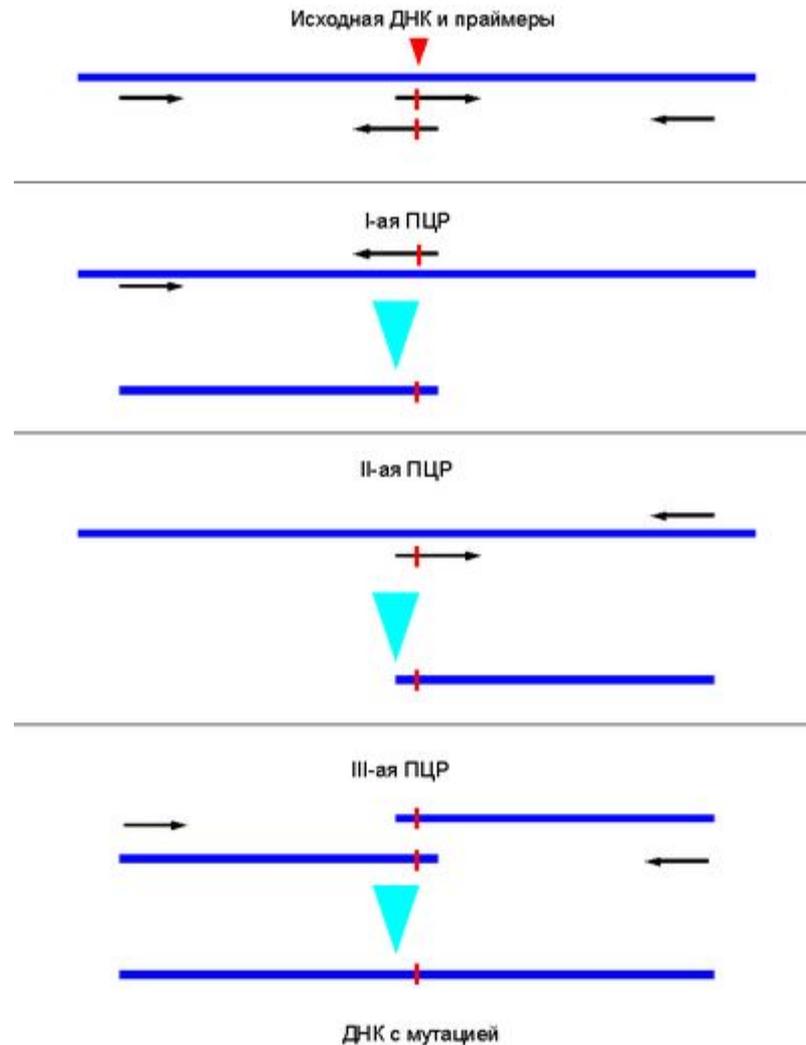
Минск, 2014

Генно-инженерная технология революционизировала иммунологию, сформировав направление, получившее название "инженерия антител", целью которого является получение на основе генов иммуноглобулинов несуществующих в природе конструкций с заданными свойствами.

Методы генетической инженерии дают возможность эффективно менять как макро- так и микроструктуру получаемых искусственных антител.

**Примером первого** является изменение изотипа антитела путем использования генов, кодирующих соответствующую Fc-область.

**Примером второго** - точечные замены аминокислот путем направленного мутагенеза, приводящие к изменению эффекторных функций, если замена произведена в Fc-области, или к изменению сродства (как повышению, так и понижению) к антигену, когда меняются остатки в CDR-участках переменных доменов.



**Сайт-направленный мутагенез.** Синтезируют пару праймеров, несущих мутацию, и пару праймеров, комплементарных концам нужного фрагмента ДНК. В ходе первых двух реакций образуются фрагменты ДНК с мутацией, которые объединяют в третьей реакции. Полученный фрагмент вставляют в нужную генно-инженерную конструкцию.

Следующим этапом развития гибридной технологии после получения гибридом стало получение "квадром" - клеточных линий, получаемых в результате слияния двух гибридом, продуцирующих антитела разной специфичности. В результате удастся создать клетки, секретирующие бифункциональные иммуноглобулины, имеющие в одной молекуле два разных по специфичности центра связывания антигена и обладающие таким образом сродством к двум различным антигенам. Все упомянутые выше антитела и их производные широко используются главным образом для целей диагностики и биотехнологии. Их применение для терапии и диагностики *in situ* ограничивается тем, что в основном с помощью гибридной технологии удастся получить молекулы мышинных иммуноглобулинов, которые вызывают у человека иммунный ответ, что приводит к их нейтрализации. Именно это обстоятельство инициировало поиск путей снижения иммуногенности мышинных моноклональных антител путем удаления отдельных фрагментов или замены их на аналогичные участки иммуноглобулинов человека.

В последние годы применение моноклональных антител в научно-исследовательской и клинической практике сильно возросло, во многом благодаря такому свойству антител, как чрезвычайно **высокая специфичность**. Начали создаваться моноклональные антитела, «заточенные» под применение в той или иной сфере клинической практики: менее иммуногенные, меньших размеров, большей аффинности или несущие на себе специальные терапевтические или диагностические лиганды, например, радиометки, флуоресцентные метки, токсины или ферменты, превращающие неактивное пролекарство в активную цитотоксическую форму.

После того, как был разработан способ получения мышинных моноклональных антител, чрезвычайно возрос интерес к применению иммунотерапии антителами злокачественных опухолей. Однако интерес этот начал быстро гаснуть, поскольку в клинической практике применения таких антител медики столкнулись с серьезными трудностями.

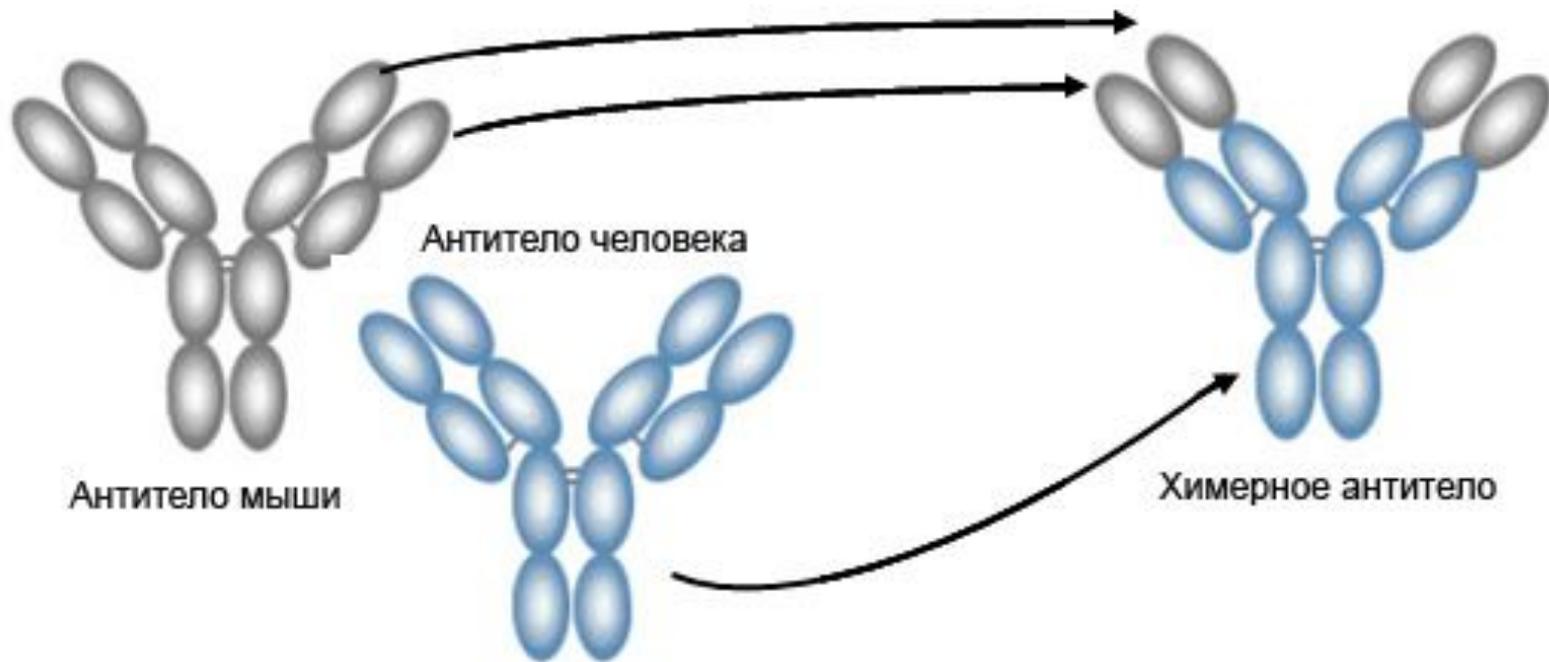
## **Трудности использования моноклональных антител в медицине.**

Первая и наиглавнейшая из них – «анти-мышиный» антительный ответ человеческой иммунной системы, направленный на вводимые с лечебной целью антитела. К другим проблемам можно отнести менее выраженную антителозависимую цитотоксичность и меньшую продолжительность жизни мышинных моноклональных антител по сравнению с человеческими. Наладить продукцию человеческих моноклональных антител оказалось также затруднительным вследствие низкого уровня гибридизации (слияния человеческих лимфоцитов с клетками миеломы) и низкой стабильности с большим трудом полученных гибридом. Вследствие всех вышеописанных обстоятельств начали развиваться технологии «очеловечивания» мышинных антител путем определенных их модификаций. Было предложено 3 подхода к модификации мышинных антител:

- 1. Химерные антитела первого поколения.**
- 2. Гиперхимерные антитела второго поколения.**
- 3. Получение биспецифических гуманизированных антител.**

## *1. Химерные антитела первого поколения.*

Ген вариабельного домена мышиного антитела клонируется и экспрессируется в системе вместе с генами константного домена человеческого антитела. Получают гибридные антитела с мышиным Fab- и человеческим Fc-доменом.

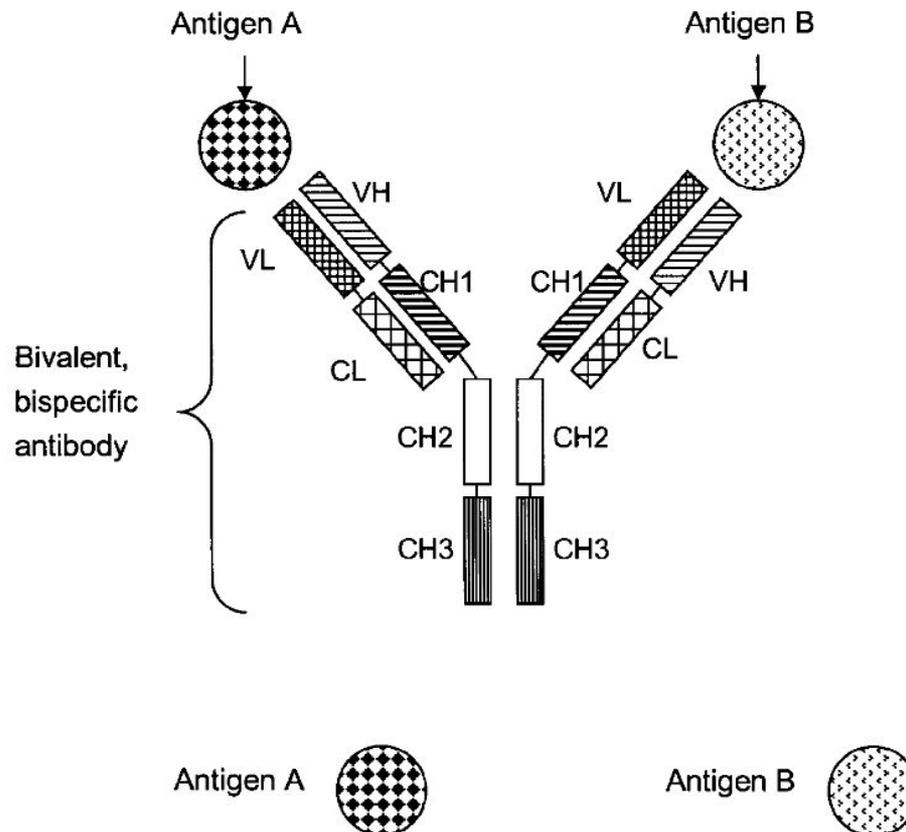


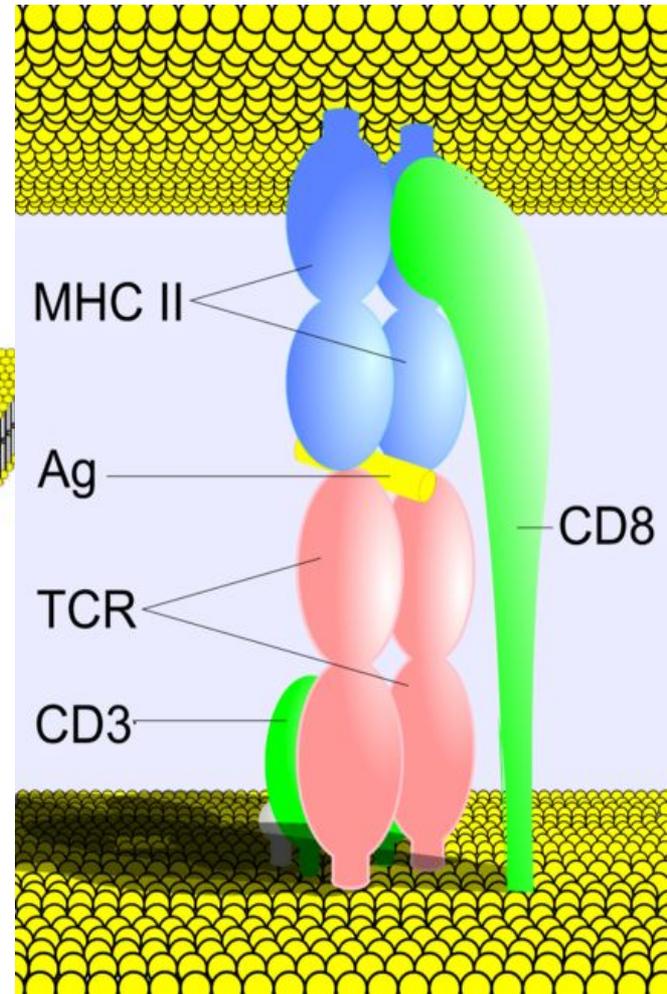
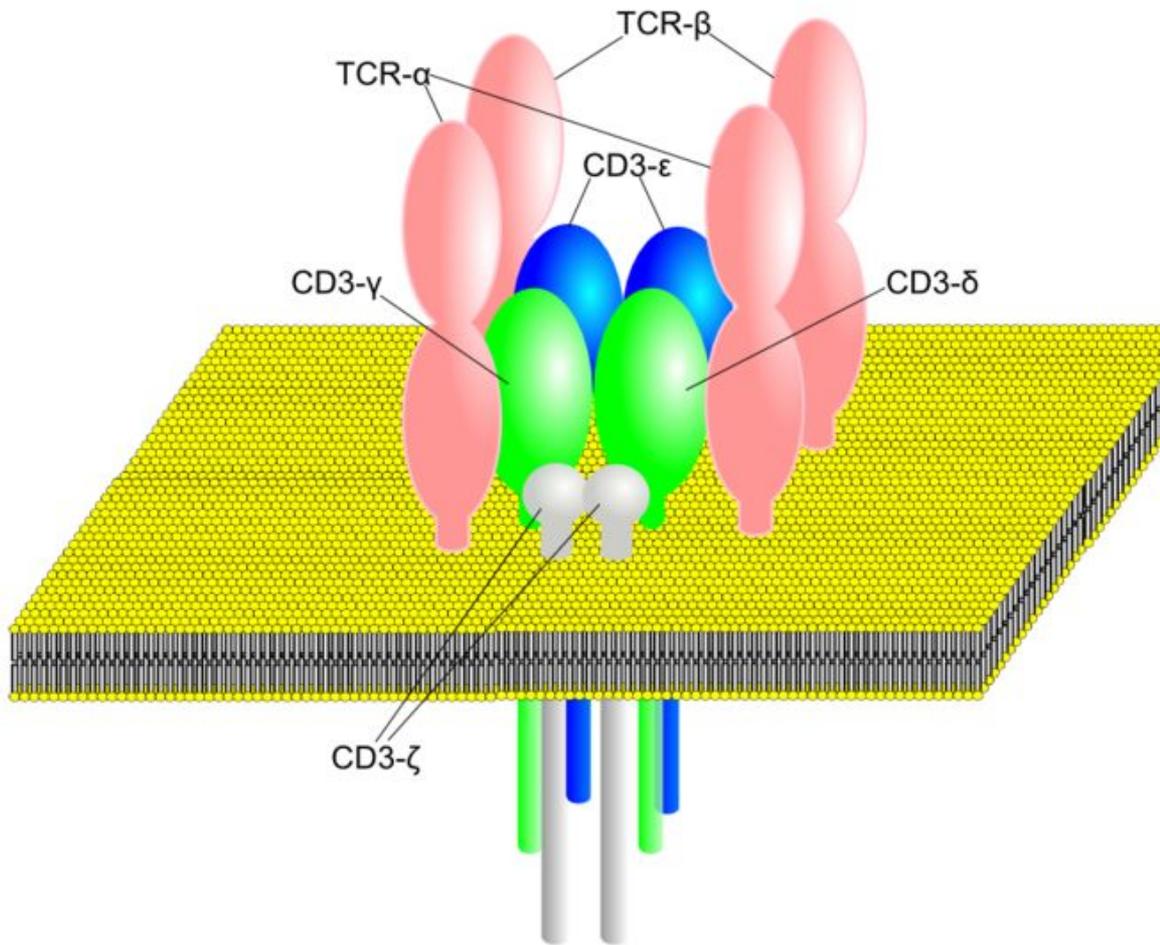
## ***2. Гиперхимерные антитела второго поколения.***

В этом подходе используются лишь минимальные фрагменты мышинового антитела, которые определяют его комплементарность к антигену, эти фрагменты как бы встроены в структуру человеческого антитела. Получаемые таким образом антитела больше похожи на человеческие, чем антитела первого поколения, и потому менее иммуногенны. Если химерное антитело содержит 30-35% мышинового и 65-70% человеческого белка, то в гиперхимерном (гуманизированном) антителе содержание человеческого белка достигает 90%, а мышинового остается только 10%. Частота образования нейтрализующих антител в ответ на введение этих модернизированных антител уменьшается с 74% в случае мышинных до 46% - химерных и 4% - гиперхимерных антител.

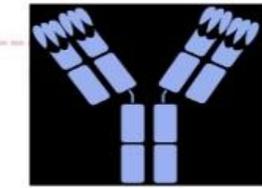
### 3. Получение **биспецифических гуманизированных антител.**

Биспецифичные антитела получают из моноклональных антител, специфичных к совершенно разным антигенам. Так, например, биспецифическое антитело, применяемое для лечения опухоли, одним плечом гипервариабельного домена связывается с поверхностным антигеном опухолевой клетки (HER2), а другим с антигенным рецептором Т-клетки (CD3), что обеспечивает их тесный контакт.



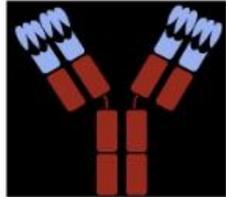


# Моноклональные антитела и «белки слияния»



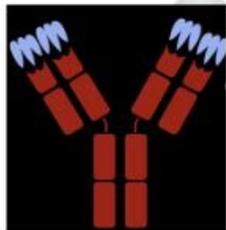
**мышинные**

Ортоклон ОКТ3, Зевалин, Бексар, Ремоваб



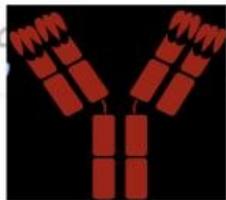
**химерные**

Реопро, Мабтера, Симулект, Ремикейд  
Эрбитукс, Адцетрис



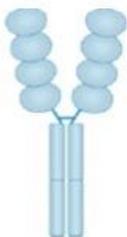
**гуманизи-  
рованные**

Зенапакс, Синагис, Герцептин,  
Милотарг, Кэмпас, Ксолар, Раптив,  
Авастин, Тивазбри, Актемра, Луцентис,  
Симзия, Солирис, Перьета



**человеческие**

Хумира, Вектибикс, Симпони  
Арзерра, Бенлиста, Ервой  
Пролиа/Эксджива



**«белки  
слияния»**

Амевив<sup>1</sup>, Энбрел<sup>2</sup>, Оренсия<sup>2</sup>  
Аркалист, Энплейт  
Эйлеа /Залтрап

## **Ортоклон, Муромонаб-CD3**

Мононуклеальные антитела против CD3 лимфоцитов человека, обладают иммунодепрессивными свойствами в отношении антигена T3 (CD3) клеток человека, предотвращают реакцию отторжения при трансплантации почек. Представляют собой мышинные моноклональные антитела в виде IgG, которые избирательно взаимодействуют с гликопротеином, находящимся на поверхности Т-лимфоцитов человека. Вследствие этого взаимодействия предотвращается реакция отторжения трансплантата.

РеоПро - это Fab-фрагмент химерных моноклональных антител 7E3, блокирует гликопротеиновые (GP) IIb/IIIa ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3) рецепторы, расположенные на поверхности тромбоцитов человека. РеоПро ингибирует агрегацию тромбоцитов в результате предотвращения связывания фибриногена, фактора фон Виллебранда и других адгезивных молекул с участком (GP) IIb/IIIa рецептора на активированных тромбоцитах.

**Перьета**, пертузумаб, относящийся к группе моноклональных антител – веществ, аналогичным тем, что вырабатываются собственной иммунной системой человека. Пертузумаб ингибирует рецепторы HER2, тем самым блокируя синтез опухолевых клеток и активизируя иммунную систему пациентов.

**Этанерцепт** — препарат, сочетающий в своей структуре два белка — препарат, сочетающий в своей структуре два белка, обычно кодируемых отдельными генами: рецептор фактора некроза опухоли (ФНО) — препарат, сочетающий в своей структуре два белка, обычно кодируемых отдельными генами: рецептор фактора некроза опухоли (ФНО) человека и Fc-участок человеческого иммуноглобулина G1 (IgG1). По принципу действия этанерцепт является ингибитором ФНО.

Другим перспективным подходом для решения проблем, обусловленных применением мышиных антител в организме человека может стать использование не целой молекулы антитела, а лишь ее части, отвечающей за связывание чужеродного антигена. Такие "минимальные антитела", или Fv - фрагменты, из-за малого размера легче проникают в опухолевую ткань и в то же время обладают пониженной иммуногенностью. В отличие от "химерных", для наработки "минимальных" антител используются дешевые и биотехнологичные бактериальные продуценты. Среди этой группы молекул выделяют:

**одноцепочечные антитела** (single chain Ab. sc Fv-fragments), которые получают в результате экспрессии V(H) и V(L)-участков, соединенных олигонуклеотидом, кодирующим гибкий гидрофильный пептид (наиболее часто (Gly4Ser)3-4);

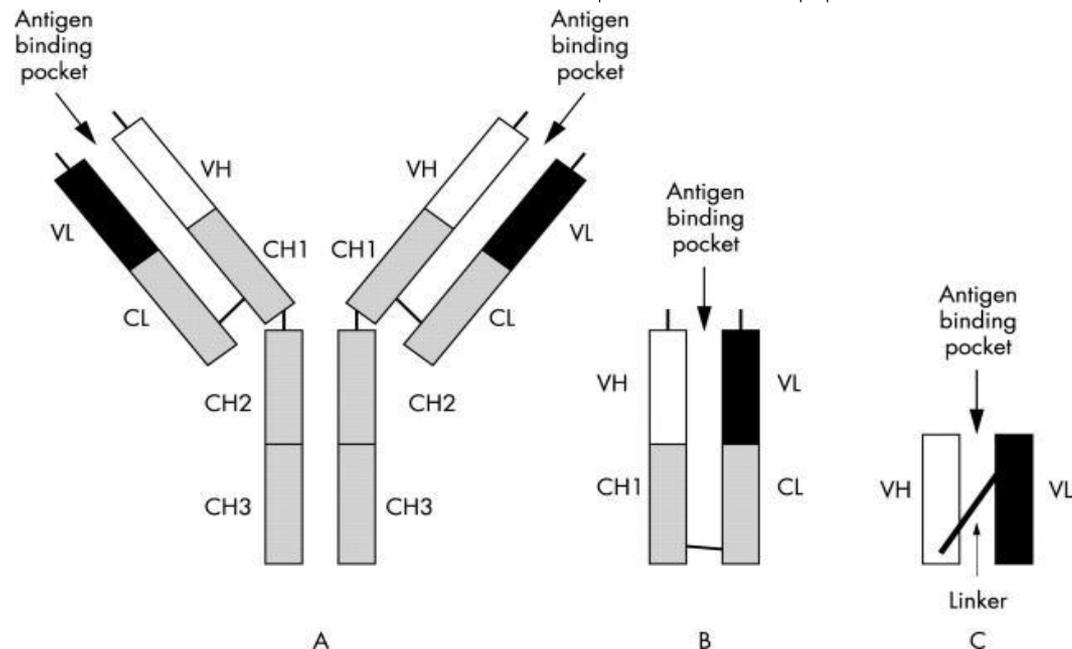
**Fv-фрагменты** - нековалентно ассоциированные гетеродимеры V(H) и V(L) -доменов. Они менее стабильны, чем sc-Fv-фрагменты. Промежуточное положение между первыми и вторыми занимают конструкции, имеющие специально введенные в область контакта доменов дисульфидные связи.

**V -домены** (domain antibody, dAb) - переменные домены тяжелых цепей. Применение основано на часто встречающемся свойстве отдельного переменного домена тяжелой цепи сохранять специфичность и высокое сродство (10% и выше от сродства исходного полноразмерного антитела) к антигену.

**минимальные узнающие пептиды** (minimal recognition units, m.r.u.) - наименьшие молекулы, сохраняющие способность связывать антиген, а именно аналоги CDR-участков переменных доменов.

# Технология получения рекомбинантных фаговых антител.

Fab- и Fv-фрагменты антител имеют те же характеристики связывания с антигеном, что и целое антитело, хотя их аффинность может быть ниже. Такие фрагменты намного легче получить рекомбинантным путем от бактерий, поскольку для их синтеза не требуется гликозилирование. Fab-фрагменты состоят из легкой и тяжелой цепей, соединенных между собой в области CL- и CH1-доменов. Однако Fv-фрагменты, состоящие только из переменных доменов легкой и тяжелой цепей, трудно получить подобным образом, т.к. переменные домены не склонны к стабильной ассоциации. Был разработан способ конструкции одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv), в которых легкая и тяжелая цепи соединены между собой коротким пептидом.

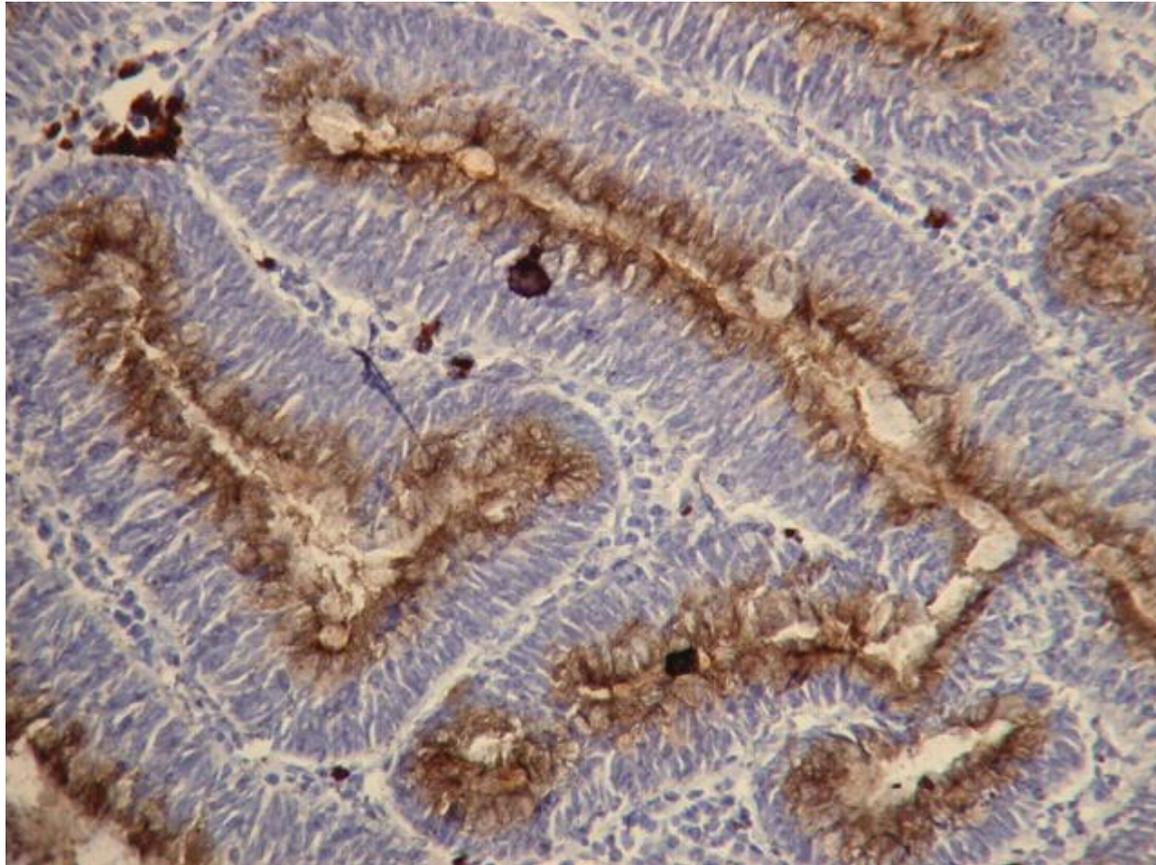


В 1990 году McCafferty и соавт. предложили методику, с помощью которой удалось добиться экспрессии scFv-фрагментов на поверхности нитевидного бактериофага. Остановимся на этой методике подробнее.

**Нитевидный фаг** – это вирусоподобная частица, способная инфицировать бактерии *E.coli*, вводя в бактериальную клетку свой генетический материал. Геном этого фага представляет собой одноцепочечную молекулу ДНК, кодирующую пять оболочечных фаговых белков. После того, как ДНК фага оказывается в клетке, она начинает реплицироваться, внутри клетки происходит сборка фаговых частиц, и новые бактериофаги секретируются во внешнюю среду, не разрушая при этом саму бактериальную клетку. С помощью генной инженерии, ДНК, кодирующую scFv-фрагмент антитела (предварительно амплифицированную с помощью ПЦР) можно «вставить» в ген оболочечного белка бактериофага, так что в итоге на поверхности фага окажется составной белок, включивший в свою структуру scFv-фрагмент.

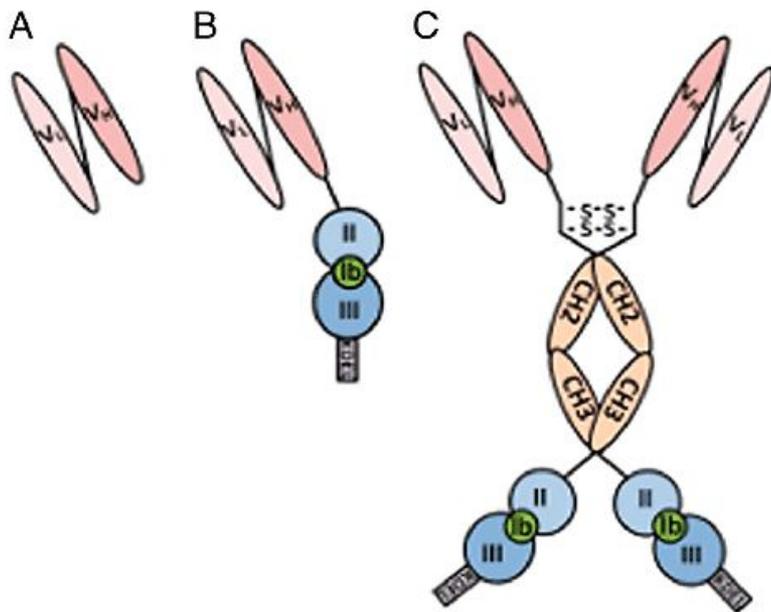
Часто используют ген белка рVIII, однако из-за того, что этот белок присутствует на поверхности фага в слишком большом количестве – 2700 копий – аффинность scFv-составных белков оказывается чересчур низкой. Поэтому чаще используется ген оболочечного белка рIII, так как он присутствует на поверхности фага всего лишь в трех-пяти экземплярах. Таким образом, на поверхности фага можно экспрессировать scFv-фрагменты антител любой специфичности, что делает возможным создание т.н. фаговой библиотеки. Из такой библиотеки можно будет отобрать фага необходимой специфичности и легко размножить его, получив необходимое число копий scFv-фрагментов антител к какому-либо антигену. Самый простой способ провести селекцию фага нужной специфичности – инкубировать фаги с антигеном, сорбированным на подложке. Все фаги, не связавшиеся с антигеном, удаляются при отмывке, а специфичные к антигену фаги (т.е. связавшиеся с ним) изолируются, размножаются, подвергаются очистке и используются в различных целях.

Используют такие компоненты антител в качестве лабораторных реагентов, заменяющих обычные антитела, например, в проточной цитометрии или иммуногистохимическом и иммуноферментном анализах. На рисунке продемонстрировано иммуногистохимическое окрашивание аденомы толстой кишки с применением фаговых антител, специфичных к эндотелиальному ростовому фактору VEGF-A.



# Иммунотоксины и иммуноферменты рекомбинантные

Рекомбинантные иммунотоксины и иммуноферменты получают в результате экспрессии иммуноглобулиновых генов, соединенных с генами токсинов или ферментов. В зависимости от размера фрагмента иммуноглобулинового гена различают, например, sc-Fv-токсин или Fab-токсин. Основные достоинства - воспроизводимость и биотехнологичность препаратов (в отличие от традиционных конъюгатов), а также значительно меньший размер получаемых молекул, что является принципиальным для использования в случае ряда заболеваний.



Структуры белков-иммунотоксинов, синтезированных в хлоропластах *Chlamydomonas reinhardtii*. А — фрагмент антитела (вариабельная область), узнающий белок CD22. В — иммунотоксин: фрагмент антитела, соединенный с биологически активными доменами II и III белкового экзотоксина *A* синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa*. С — усовершенствованный иммунотоксин с повышенной активностью и устойчивостью: димер структуры В, в который дополнительно встроена константная область антитела.

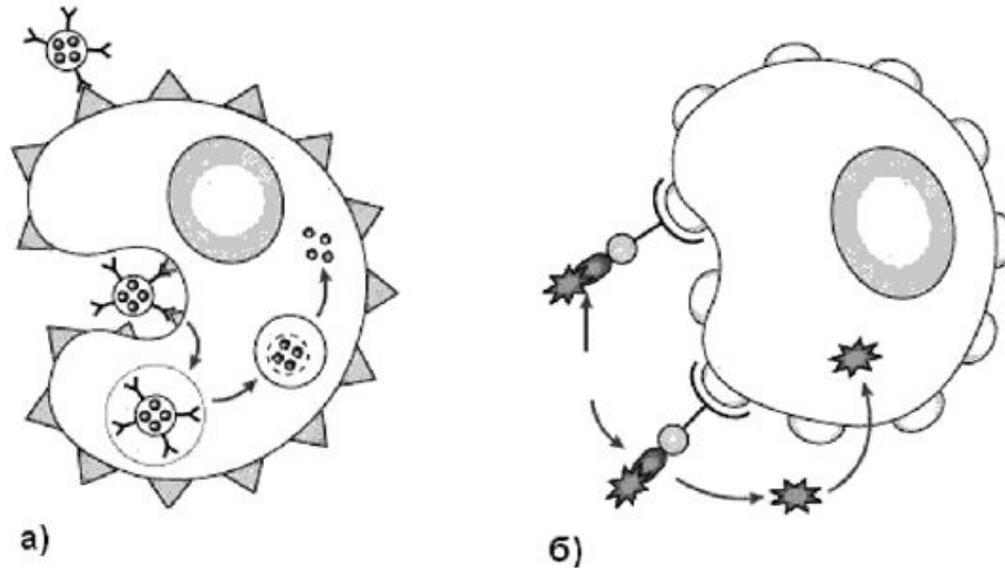
**Абзимы, каталитические антитела** — моноклональные антитела, обладающие каталитической активностью. Существуют как природные абзимы (в молоке, в сыворотке крови больных аутоиммунными заболеваниями, гепатитом, СПИДом), так и искусственные абзимы (напр., абзимы, гидролизующие эфиры динитрофенола). Абзимы обладают уникальной способностью катализировать любые химические реакции в дополнение к тем, для которых существуют естественные белки ферменты; в частности абзимы-нуклеазы, расщепляющие ДНК (ДНК-А. ) и РНК (РНК-А. ). Абзимы создаются с помощью введения кофакторов и каталитических групп в уже существующие антитела, сайт-направленного мутагенеза, на основе антиидиотипических антител и др. подходов. Считается, что наиболее часто ферментативная реакция происходит по механизму стабилизации переходного состояния субстрата. Фермент удерживает это нестабильное переходное состояние и тем самым увеличивает вероятность превращения субстрата в продукт реакции. Аналогичный механизм был полностью доказан для каталитических АТ. В этом случае для индукции АТ с абзимной активностью проводят иммунизацию антигеном – стабильным аналогом переходного состояния какого-либо субстрата. Полученные каталитические АТ стабилизируют переходное состояние субстрата и тем самым ускоряют его превращение. Кроме того, абзимы, фиксируя антиген (и его переходное состояние), способны уменьшать энтропию реакции.

**Иммуноадгезины** (immunoadhesins) обычно состоят из Fc-фрагмента молекулы антитела и лиганда, специфичного к определенному рецептору, например CD4 . Такая молекула за счет CD4-фрагмента будет связываться с белком gp120 на поверхности клеток, инфицированных вирусом иммунодефицита человека , и за счет Fc-фрагмента вызывать их уничтожение посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности или действия системы комплемента.

## **Иммунолипосомы**

Одним из перспективных направлений в снижении токсичности противоопухолевых препаратов является использование липосом для их транспорта и целенаправленной доставки. Данные последних лет подтверждают способность липосом транспортировать лекарственное средство, снижать его общетоксическое действие, увеличивать терапевтический эффект. Эти результаты позволяют надеяться на широкое использование липосом при химиотерапии онкологических больных.

Для улучшения направленной доставки противоопухолевых препаратов было разработано новое поколение лекарственных препаратов — иммунолипосомы. Иммунолипосомы представляют собой липосомы с прикрепленными моноклональными антителами. Моноклональные антитела обеспечивают специфическое связывание липосом с антигенами клеток, а липосомы несут соответствующий химиотерапевтический препарат.



а)

б)

-  иммунолипосома с включенным лекарственным веществом
-  высвобожденное лекарство
-  антитело-ферментный конъюгат для ADEPT
-  пролекарство
-  активное лекарство

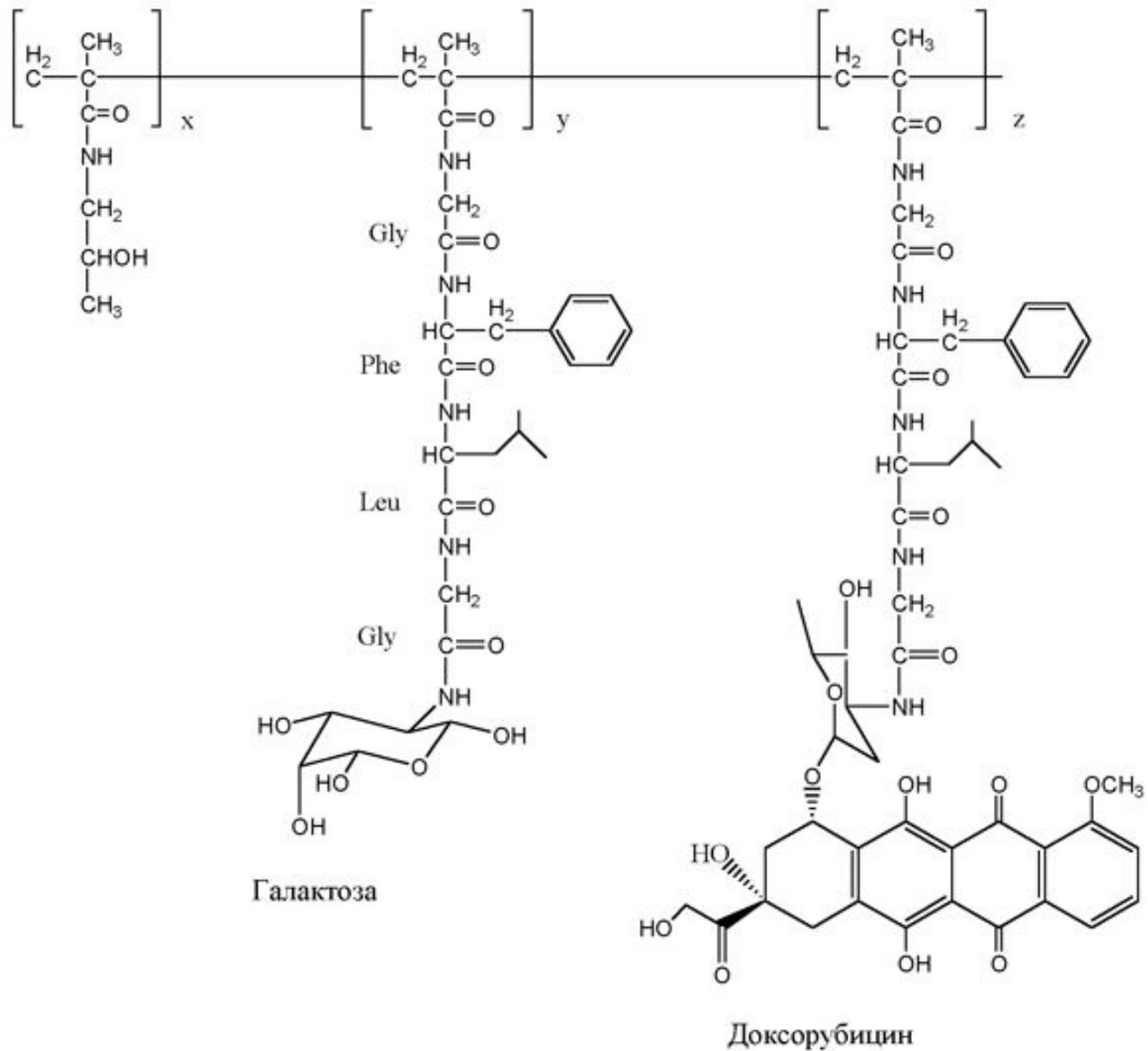
В настоящее время различают три типа иммунолипосом: А, В и С. Иммунолипосомы типа А — моноклональные антитела ковалентно связаны с обычными липосомами посредством короткого якоря; иммунолипосомы типа В — моноклональные антитела ковалентно связаны с пегилированными липосомами посредством короткого якоря; иммунолипосомы типа С (Pendant-type PEG-immunoliposomes) — моноклональные антитела прикреплены к дистальному терминальному концу ПЭГ.

На примере липосом типа А было показано, что иммунолипосомы более эффективно, чем обычные липосомы, доставляют лекарства в клетки-мишени как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако связывание иммунолипосом с клетками-мишенями *in vivo* было более сложным. Изучение *in vivo* показало, что прикрепление к липосомам антител усиливало их захват клетками РЭС, а эффективность их связывания с клетками-мишенями зависела от плотности антител на поверхности липосом. Явление захвата иммунолипосом клетками РЭС и функционирование эндотелиального барьера, разделяющего сосудистое русло от опухолевой ткани, позволило создать липосомы типа В, которые были стерически стабилизированы и имели удлиненные периоды циркуляции в крови. Прикрепление моноклональных антител к дистальным концам цепей ПЭГ, связанным с липосомами (тип С), привело к сохранению способности стерически стабилизированных липосом специфически связываться с клеточной поверхностью клеток-мишеней и быть защищенными от захвата клетками РЭС.

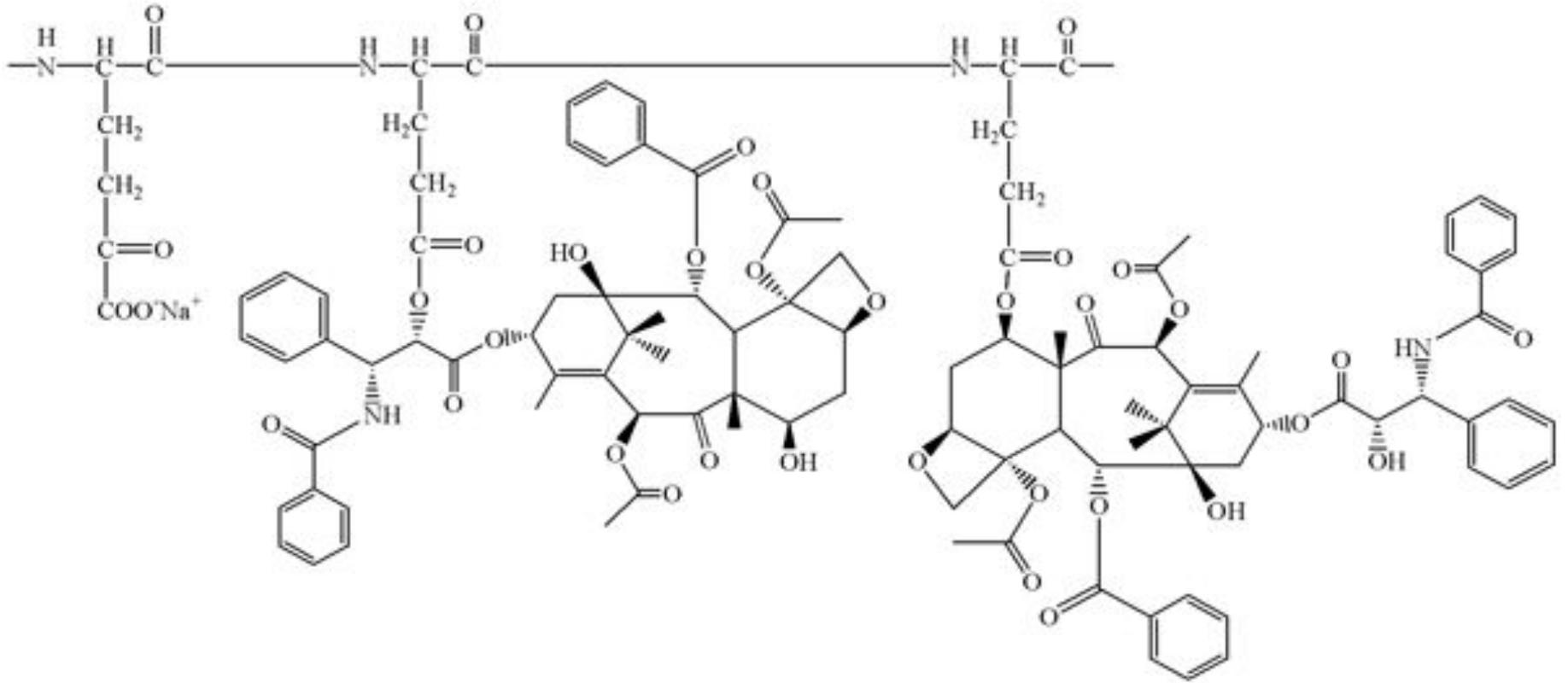
## Иммунополимеры

Биоконъюгаты лекарственных препаратов с биodeградируемыми, растворимыми в воде полимерами, например, гидроксипропилметакриамином (ГПМА), начинают исследоваться в качестве переносчиков. Как и иммунолипосомы, иммунополимеры могут изменять фармакокинетику и распределение связанных препаратов. Для их дальнейшего биологического действия необходимо высвобождение препаратов из комплекса с полимером, поэтому в качестве биodeградируемых связывающих мостиков между полимером и лекарственным препаратом используется, например, тетрапептид Gly-Phe-Leu-Gly, который разрушается катепсином В в лизосомах клетки после пиноцитического захвата иммунополимера.

Случайное связывание моноклональных антител с полимерами может привести к снижению активности антител, поэтому был предложен новый подход, в котором фрагменты метакриламид-Fab с полиэтиленгликолевым мостиком были сополимеризованы с ГПМА и лекарственным препаратом с деградируемым пептидным мостиком.



**галактозомин-направленный ГПМА-полимерный доксорубицин**



**ПГК-паклитаксел (конъюгат паклитаксела с полиглутаминовой кислотой, ХУОТАХ) и ПЭГ-каптотецина (PROTHECAN)**

**Спасибо за внимание**