



* Фаговый дисплей

* Основные направления применения фагового дисплея:

* • Фаговый дисплей пептидов

* - Изучение рецепторов и картирование сайтов связывания

* антител

* - Создание иммуногенов и нановакцин

* - Картирование сайтов связывания субстратов для протеаз

* и киназ

* • Фаговый дисплей белков и белковых доменов

* - Отбор антител с заданными свойствами

* - Изучение белок-лигандных взаимодействий

* - Скрининг экспрессируемых фрагментов кДНК

* - Направленная эволюция белков

Illustrations: Niklas Elmehed

THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2018



Frances H.
Arnold

“for the directed
evolution
of enzymes”

George P.
Smith

“for the phage display of peptides
and antibodies”

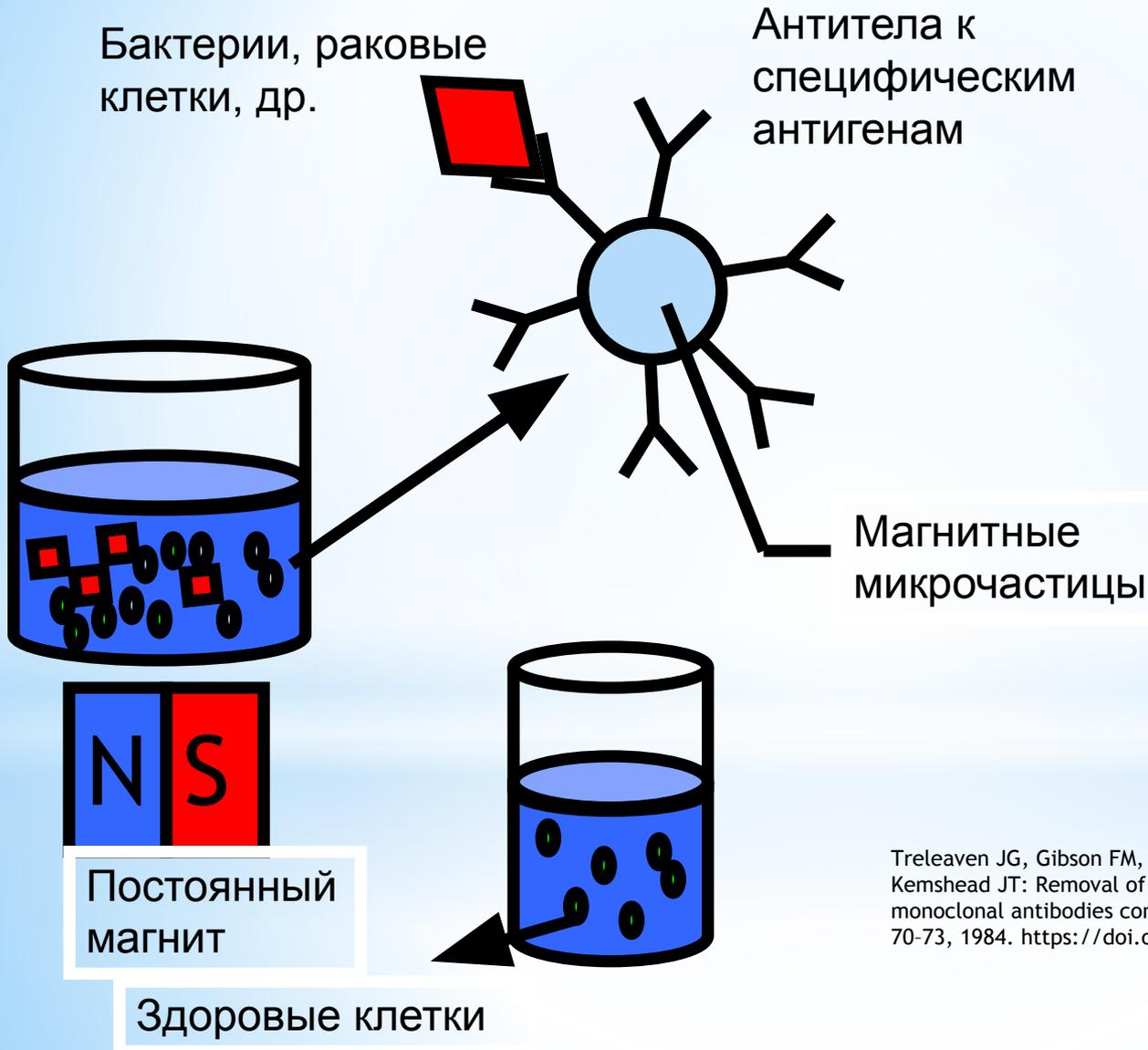
Sir Gregory P.
Winter

THE ROYAL SWEDISH ACADEMY OF SCIENCES

* Стратегии поиска лекарств

- * Разработка способов направленного транспорта общетоксичной активной субстанции к мишени
- * Использование в качестве активных субстанций веществ, обладающих высокой селективностью

Простое и гениальное решение, но нужны антитела к раковым клеткам



1984 год

Джон Унгельстад

Аутотрансплантация клеток костного мозга пациента, больного лейкемией, очищенных от злокачественных клеток с помощью магнитных сорбентов

Treleaven JG, Gibson FM, Ugelstad J, Rembaum A, Philip T, Caine GD, Kemshead JT: Removal of neuroblastoma cells from bone marrow with monoclonal antibodies conjugated to magnetic microspheres. Lancet p 70-73, 1984. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(84\)90004-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(84)90004-7)

Получение моноклональных антител

Нобелевская премия 1984 года



Цезарь Мильштейн
(Cesar Milstein)



Георг Кёлер
(George Kohler)

Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975;256(5517):495-7. doi:10.1038/256495a0.

Galfre G. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. Nature. 1977;266(5602):550-2. doi: 10.1038/266550a0

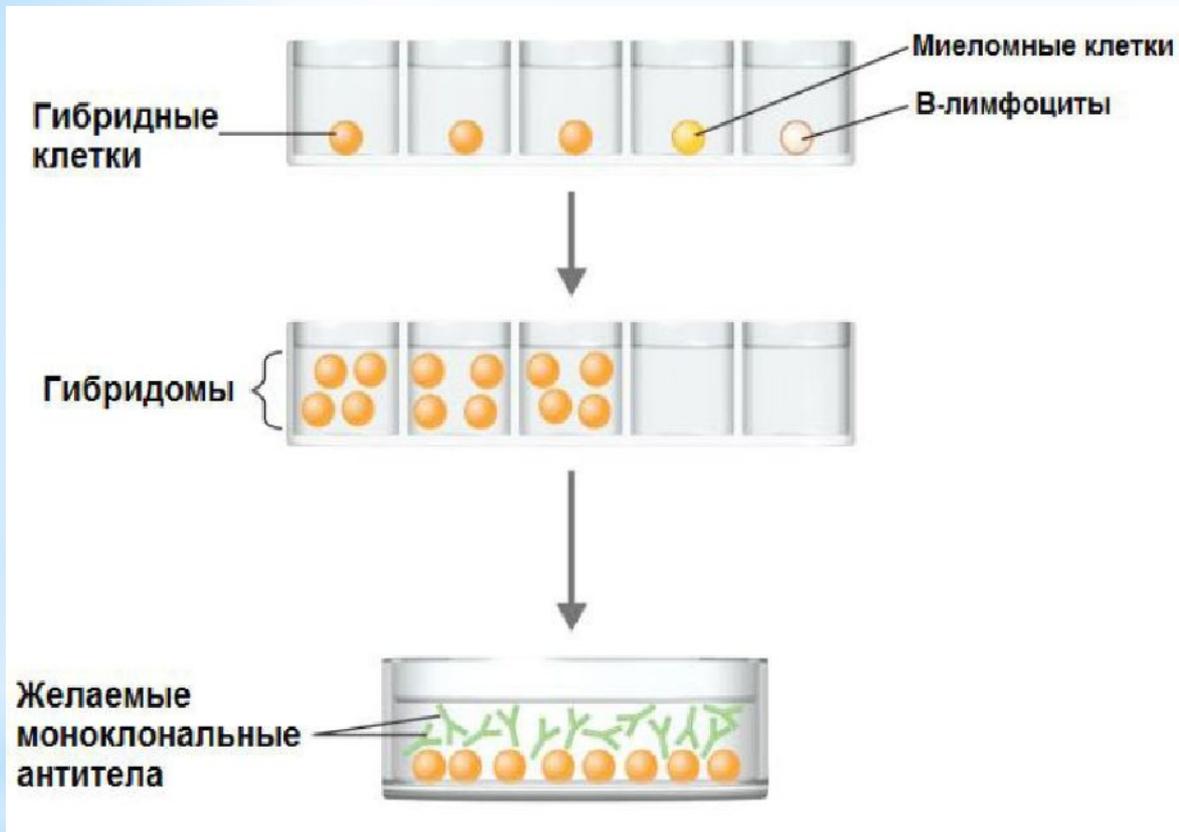


Мыши вводят специфический антиген, который вызывает продукцию антител против этого антигена.

Селезенка мышей удаляется и гомогенизируется для получения суспензии клеток. Эта суспензия содержит В-клетки, которые продуцируют антитела против введенного антигена.

Клетки селезенки затем смешивают с клетками миеломы, которые способны непрерывно расти в культуре, а так же отсутствует резервный путь синтеза нуклеотидов.

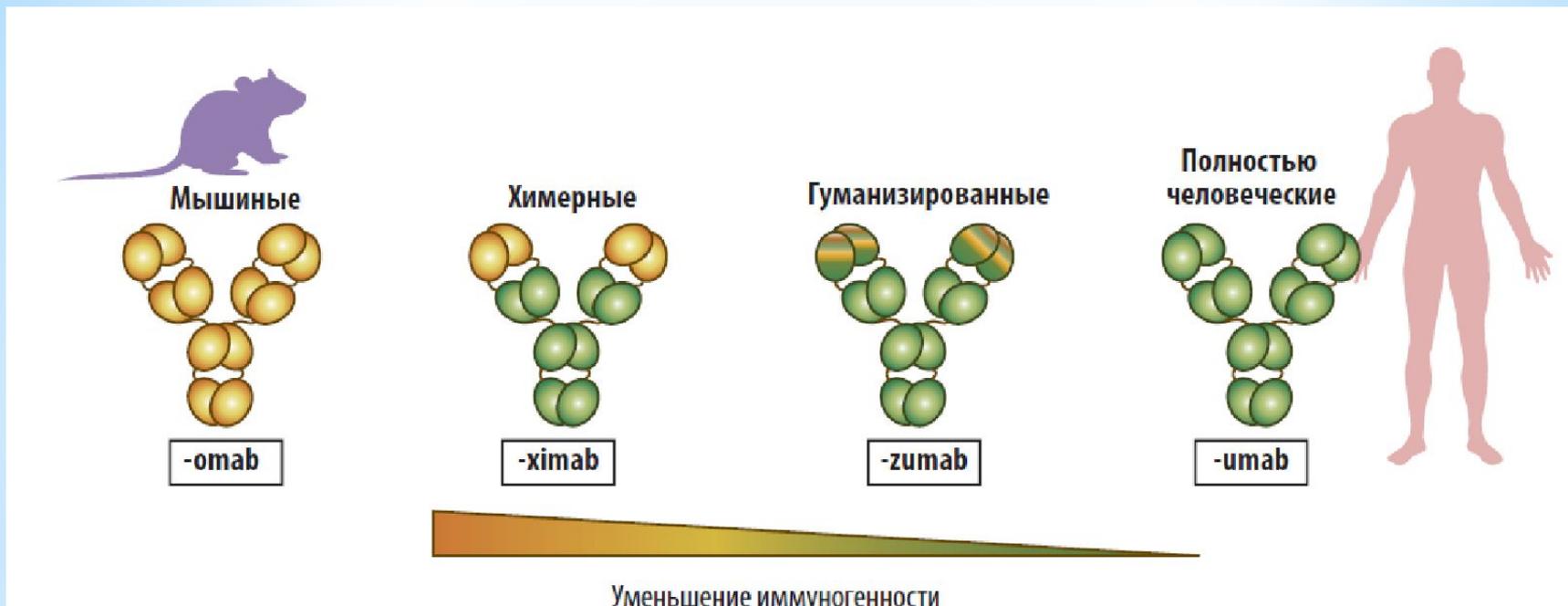
Некоторые из антитело-продуцирующих клеток селезенки и клетки миеломы сливаются, образуя гибридные клетки. Эти гибридные клетки теперь способны непрерывно расти в культуре, а так же продуцировать антитела.



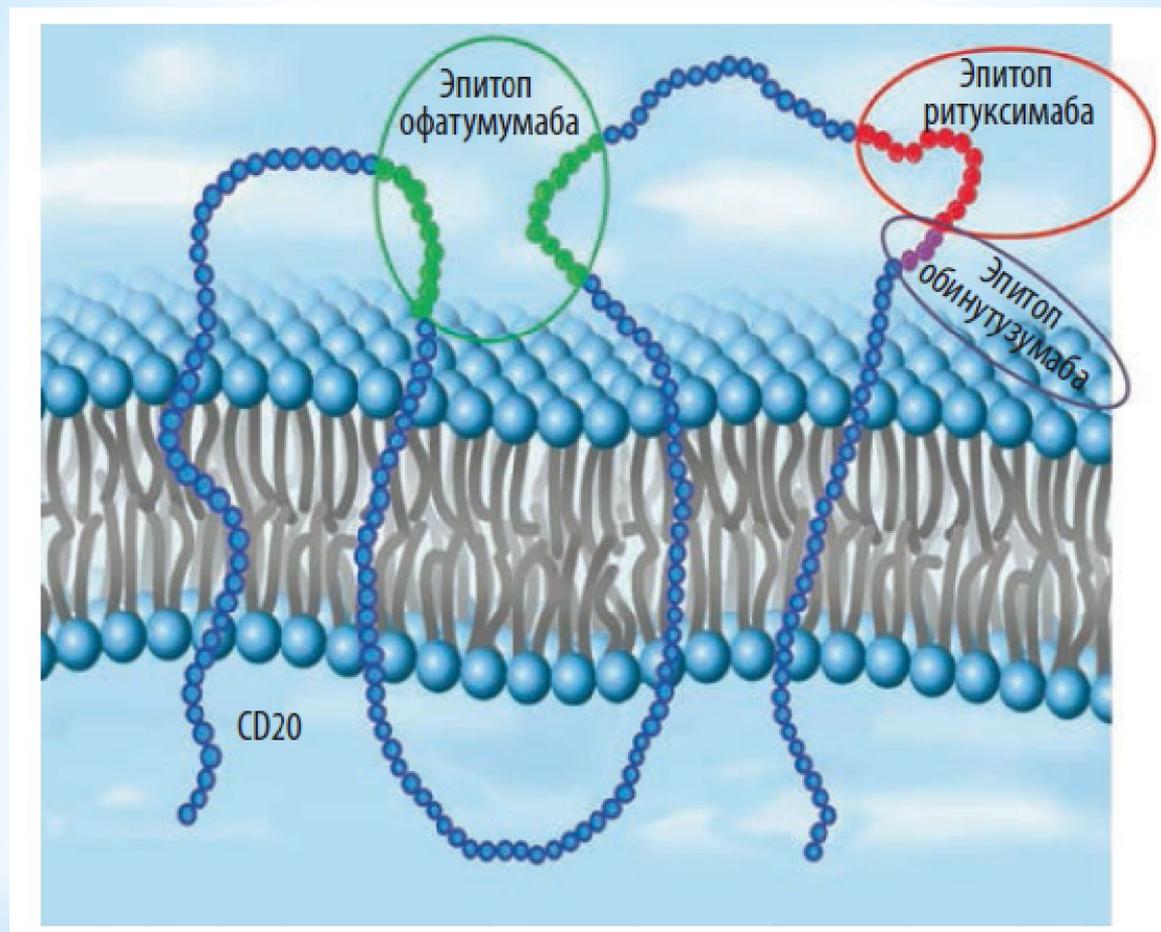
Смесь клеток помещают в селективную среду, которая позволяет расти только гибридным клеткам. Погибают не слившиеся миеломные клетки и В-лимфоциты.

Гибридные клетки пролиферируют, образуя клон гибридом. Гибридомы проверяются на продукцию нужных антител.

Выбранные гибридомы затем культивируют для получения больших количеств моноклональных антител.



Типы моноклональных антител и их номенклатура. Окончания названий препаратов моноклональных антител различных типов указаны в рамках



Структура CD20 и эпитопы, к которым присоединяются ритуксимаб, офатумумаб и обинутузумаб. CD20 имеет 4 трансмембранных участка и 2 внеклеточных петли. Эпитоп, с которым связывается ритуксимаб, окрашен красным цветом; эпитоп связывания офатумумаба находится на 2 петлях, окрашен зеленым цветом; эпитоп связывания обинутузумаба отмечен фиолетовым цветом

Shah A. New developments in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: role of obinutuzumab. Ther Clin Risk Manage. 2015;11:1113-22. doi: 10.2147/TCRM.S71839

* Противоопухолевые препараты на основе МкАТ

* Трастузумаб (Trastuzumab, Герцептин) - рекомбинантное МкАТ, которое избирательно связывается с рецептором HER2 на поверхности опухолевых клеток многих солидных опухолей. Препарат Herceptin (Trastuzumab) был разработан компанией Genentech и введен в клиническую практику в 1998 году.

Ритуксимаб (Rituximab) представляет собой первое и наиболее изученное к настоящему времени антитело, одобренное Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) еще в 1997 г. Препарат представляет собой химерное МКА мыши/человека, которое специфически связывается с антигеном CD20. Этот антиген – трансмембранный фосфопротеид, экспрессируется на поверхности пре-В-лимфоцитов и зрелых В-лимфоцитов, но отсутствует на стволовых гемопоэтических клетках, нормальных плазматических клетках и клетках других тканей

Riley JK, Sliwkowski MX. CD20: a gene in search of a function. Semin Oncol. 2000;27(12):17-24.

*Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. Immunol Today. 1994;15(9):450-4.
doi: 10.1016/0167-5699(94)90276-3.*

Ритуксимаб применяется так же в терапии следующих заболеваний:

системная красная волчанка, ревматоидный артрит, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, васкулит, связанный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами, болезнь Грейвса, аутоиммунная гемолитическая анемия, пузырьчатка обыкновенная, гемофилия А, синдром Шегрена, криоглобулинемия, IgM-опосредованная нефропатия, рассеянный склероз, оптикомиелит (болезнь Девика), дерматомиозит; препарат также используется при реакции «трансплантат против хозяина»

Gurcan H, Keskin D, Stern J, et al. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol.* 2009;9(1):10-25. doi: 10.1016/j.intimp.2008.10.004

Офатумумаб (Ofatumumab, ранее – биопрепарат НуМах-CD20) является полностью человеческим анти-CD20-МКА. Одобрен FDA 17 апреля 2014 г. для лечения хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), не поддающегося терапии флударабином и алемтузумабом. Кроме того, препарат показал свою активность при лечении фолликулярной и диффузной В-крупноклеточной лимфом.

Cang S, Mukhi N, Wang K, Liu D. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. J Hematol Oncol. 2012;5(1):64. doi: 10.1186/1756-8722-5-64.

Клинические исследования анти-CD20-МКА продолжаются, равно как и разработка новых препаратов (окрелизумаб — PRO70769, АМЕ-133v — ocaratuzumab, PRO131921). В апреле 2014 г. Министерством здравоохранения Российской Федерации был зарегистрирован первый биоаналог ритуксимаба российского производства.

Алексеев С.М., Капланов К.Д., Иванов Р.А., Черняева Е.В. Современный подход к разработке и исследованию биоаналогов на примере первого российского препарата моноклональных антител — Ацеллбия® (ритуксимаб). Исследования и практика в медицине. 2015;2(1):8-12. doi: 10.17709/2409-2231-2015-2-1-8-12

* Радиоиммунотоксины на основе анти-CD20 антител

* Ибритумомаб (ibritumomab, Зевалин) является конъюгатом Мабтеры (МкАТ против CD20) с радиоактивным изотопом иттрия-90 (^{90}Y). В-излучение, $T_{1/2} = 2,67$ сут.

* Бексар (^{131}I Tositumomab, Веххар) - конъюгат мышинового МкАТ против CD20 антигена с радиоактивным изотопом йода ^{131}I . В-излучение, $T_{1/2} = 8$ сут.

- * Против воспалительного процесса Наиболее важной “мишенью” для “антицитокиновой” терапии МкАТ является “провоспалительный” цитокин - фактор некроза опухоли (ФНО) - α .
- * Цетуксимаб (Эрбитукс) – химерное МкАТ, блокирующее рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и лишаящие опухоли необходимого для нее фактора роста. В 2003 г. Эрбитукс был зарегистрирован в США для лечения рака толстой кишки, а в 2006 г. – для лечения рака головы и шеи. В России препарат продается под названием Эрбитукс.
- * Tysabri (natalizumab) - блокатор рецептора адгезии VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ -integrin) предотвращает адгезию иммуновоспалительных клеток и их миграцию через гематоэнцефалический барьер и стенку кишечного тракта. Используется при лечении рассеянного склероза и болезни Крона.
- * Anakinra (Kineret) рекомбинантный растворимый антагонист ИЛ-1, подавляющий функциональную активность ИЛ-1. Для лечения РА.

- * **Этанерцепт (Etanercept, Энбрел)** - Рекомбинантный белковый препарат который получают соединением ФНО-рецепторов с Fc-фрагментом молекулы IgG1, действует как экзогенный растворимый ФНО-рецептор. Этанерцепт связывает и инактивирует молекулы ФНО- α . Зарегистрирован в США для лечения РА при средней и высокой активности заболевания и резистентности к обычной терапии. На ранних стадиях ревматоидного артрита применение этанерцепта замедляет прогрессирование заболевания.
- * **Адалимумаб (Хумира)** - первый и пока единственный препарат, представляющий собой полностью человеческие рекомбинантные моноклональные антитела к ФНО- α . Результаты проведенного анализа, соответствующие критериям "медицины, основанной на доказательствах", свидетельствуют о том, что инфликсимаб и адалимумаб являются эффективными препаратами для лечения ревматоидного артрита (РА), резистентного к стандартной терапии.
- * **РЕМИКЕЙД (инфликсимаб) - Infliximab (REMICADE®)**, представляет собой моноклональные антитела к одному из ключевых цитокинов, вовлеченных в развитие воспалительных процессов, - фактору некроза опухоли (tumor necrosis factor alpha - TNF-alpha). Как полагают исследователи, TNF также играет важную роль не только в развитии ревматоидного артрита, но и псориаза.

* В 2015 г. все существующие на рынке препараты (60 млрд. долл. ежегодных продаж) утратили патентную защиту.

Основы фагового дисплея

***Строение и жизненный цикл
нитчатого бактериофага**

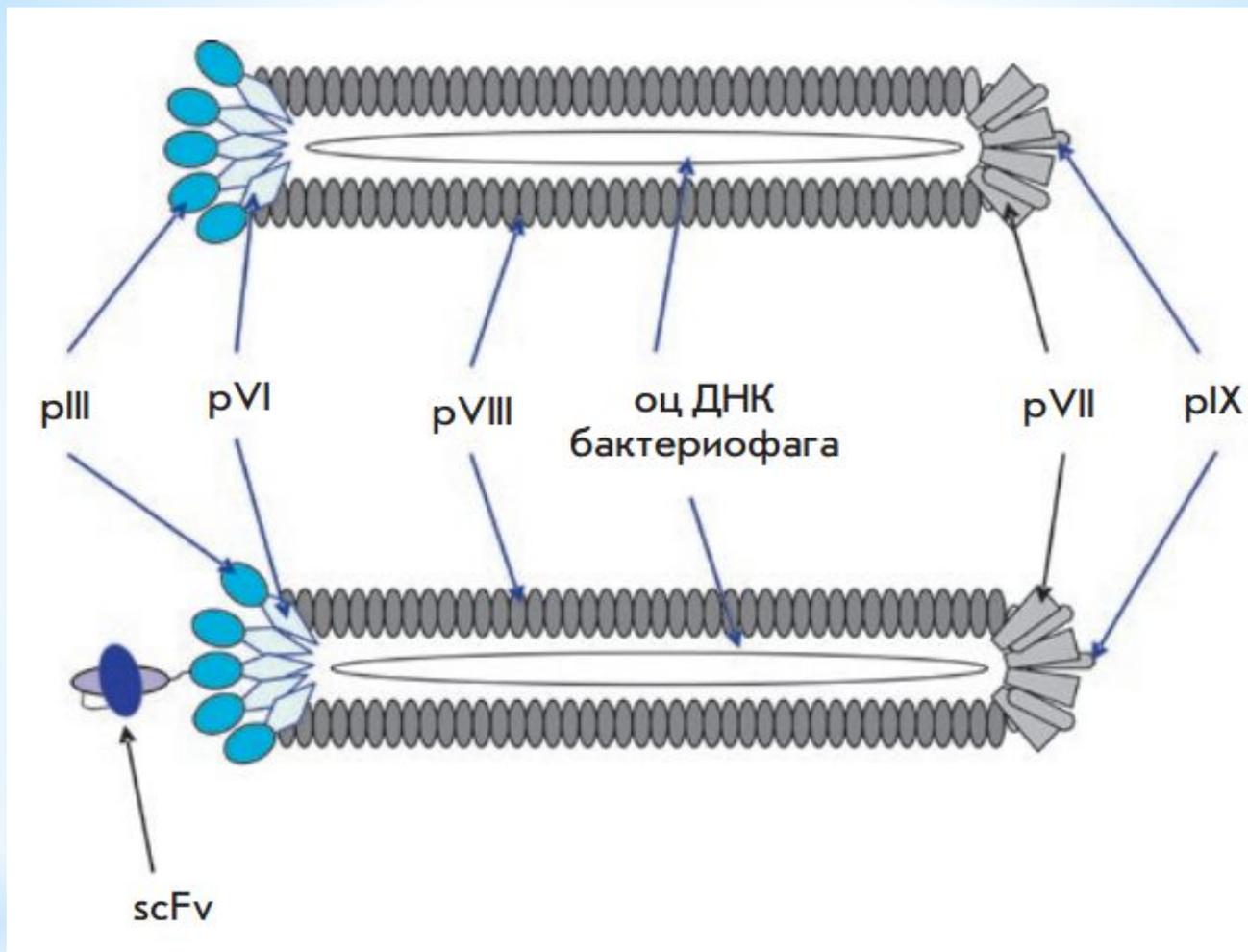
*** Геном Ff-фага представлен одноцепочечной ковалентно замкнутой (+)ДНК, 6407(8) н., кодирующей 11 генов**

- * первая группа (гены II, V, X) кодирует белки, необходимые для репликации фаговой ДНК;
- * вторая группа (гены III, VI, VII, VIII, IX) - белки оболочки;
- * третья группа (гены I, IV, XI) - белки, необходимые для сборки вирионов

* Кроме того, в ДНК бактериофага имеется межгенная последовательность (intergenic region), содержащая *ori* для синтеза (+) и (-) цепей ДНК и сайт инициации процесса сборки фаговых частиц (packaging signal)

* Оболочка

* ДНК Ff-фага заключена в гибкий цилиндр, состоящий из приблизительно 2700 копий белка оболочки pVIII. На одном из концов Ff-фага находится по 5 копий минорных оболочечных белков pIII и pVI, на другом - белки pVII и pIX.



- * Схема строения нитчатого бактериофага: а - нитчатый бактериофаг дикого типа; б - фаговое антитело на основе нитчатого бактериофага

* Репродукция

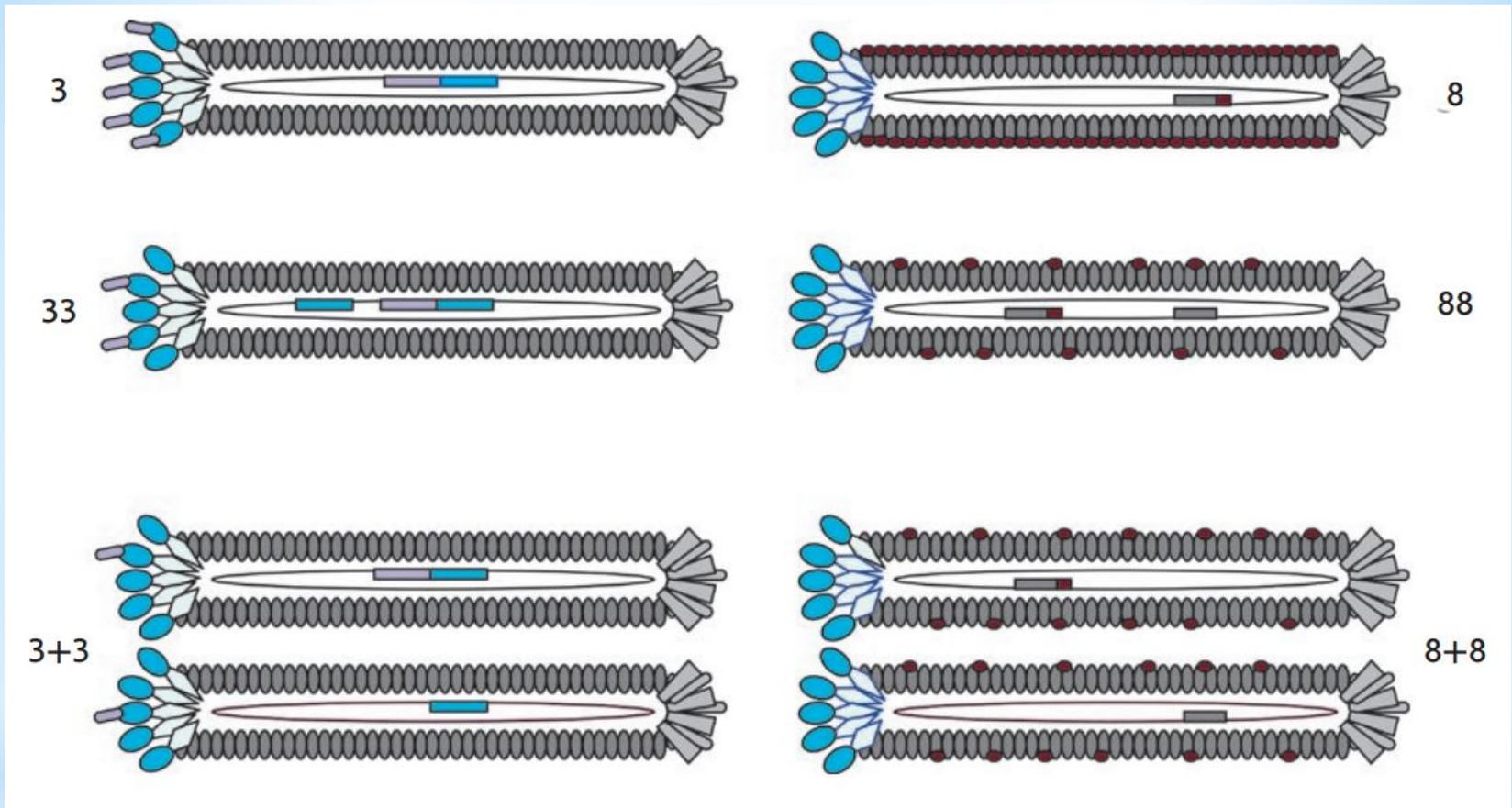
- * При инфицировании клеток *E. coli* F ϕ -фагом белок pIII специфически взаимодействует с вершущей F-пили, представляющей собой белковую трубочку, состоящую из субъединиц пилина. Ретракция пили, вследствие деполимеризации пилиновых субъединиц, притягивает бактериофаг к клетке
- * После попадания фаговой ДНК в цитоплазму она при помощи ферментов репликации *E. coli* превращается в двуцепочечную плазмидоподобную репликативную форму (RF-молекулу). Такая молекула служит матрицей для транскрипции и трансляции фаговых белков.
- * Сборка осуществляется в месте плотного контакта клеточной стенки и внутренней мембраны и продолжается до тех пор, пока конец фаговой ДНК не освободится и фаг не выйдет в среду. Сборка фаговых частиц не ведет к лизогении хозяйских клеток, и инфицированные клетки продолжают расти и делиться, хотя и медленнее, чем неинфицированные

* Фагмида

* На основе ДНК нитчатых бактериофагов были созданы новые векторные молекулы - «фагмиды», сочетающие свойства плазмиды и фага. Фагмиды содержат *ori* репликации и сигнал упаковки F ϕ -фага вместе с *ori* репликации выбранной плазмиды, а также ген III, полилинкер и ген устойчивости к антибиотикам.

* 3 и 8 векторные системы

* Для фагового дисплея были разработаны системы на основе пяти капсидных белков, однако наиболее часто используют минорный белок оболочки pIII или мажорный белок оболочки pVIII. Такие векторные системы обозначаются как 3 и 8 системы соответственно.



* Типы векторных систем на основе нитчатого бактериофага для дисплея пептидов и белков. Розовым и красным цветом обозначены чужеродные встройки в генах, кодирующих белки рIII и рVIII соответственно

*** 3+3, 8+8, 33, 88**

векторные системы

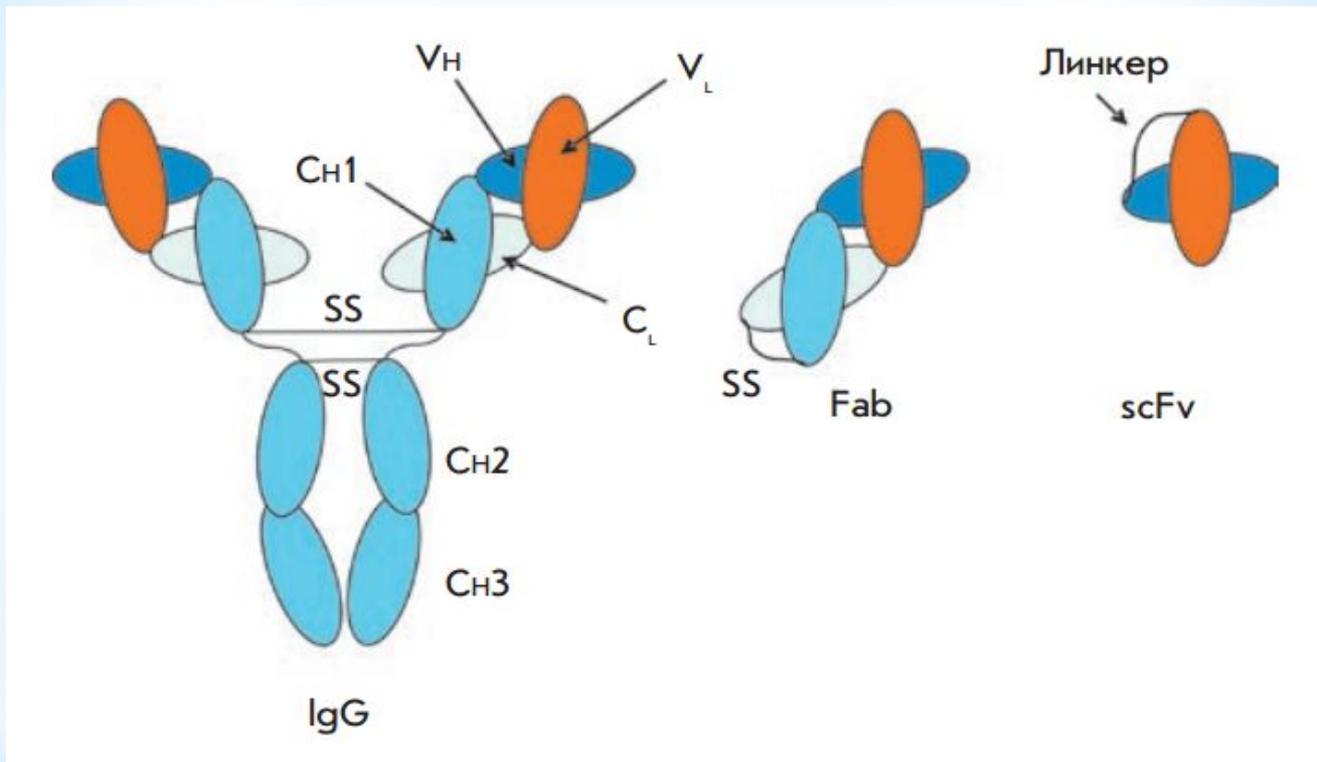
- * В векторных системах, обозначаемых как 33 или 88, дополнительный ген находится в геноме самого бактериофага вместе с рекомбинантным геном.
- * В векторных системах, обозначаемых 3+3 (характерна моновалентность) или 8+8 (характерна поливалентность), дополнительный ген вводится в клетку *E.coli* при помощи фага-помощника (helper phage), а рекомбинантный ген находится в фагмиде.

*** Векторная система 3+3
наиболее часто используется
для селекции фрагментов
антител**

*** Основные методические
этапы фагового дисплея**

* Комбинаторные библиотеки

- * Комбинаторная фаговая библиотека антител представляет собой популяцию бактериофагов, каждый из которых экспонирует на своей поверхности в составе химерного белка с pIII уникальный антиген-связывающий домен антитела, чаще всего одноцепочечное антитело (single chain variable fragment - scFv) или Fab-фрагмент.



Природный иммуноглобулин класса G и антигенсвязывающие фрагменты иммуноглобулина

- * Для создания библиотеки репертуар амплифицированных с помощью ПЦР ДНК-фрагментов, кодирующих Fab или scFv из различных источников, клонируют в фагмиду в единую рамку трансляции с геном, кодирующим белок pIII
- * При этом образуется репертуар фагмид, каждая из которых содержит ДНК-фрагмент, кодирующий индивидуальный антигенсвязывающий домен.

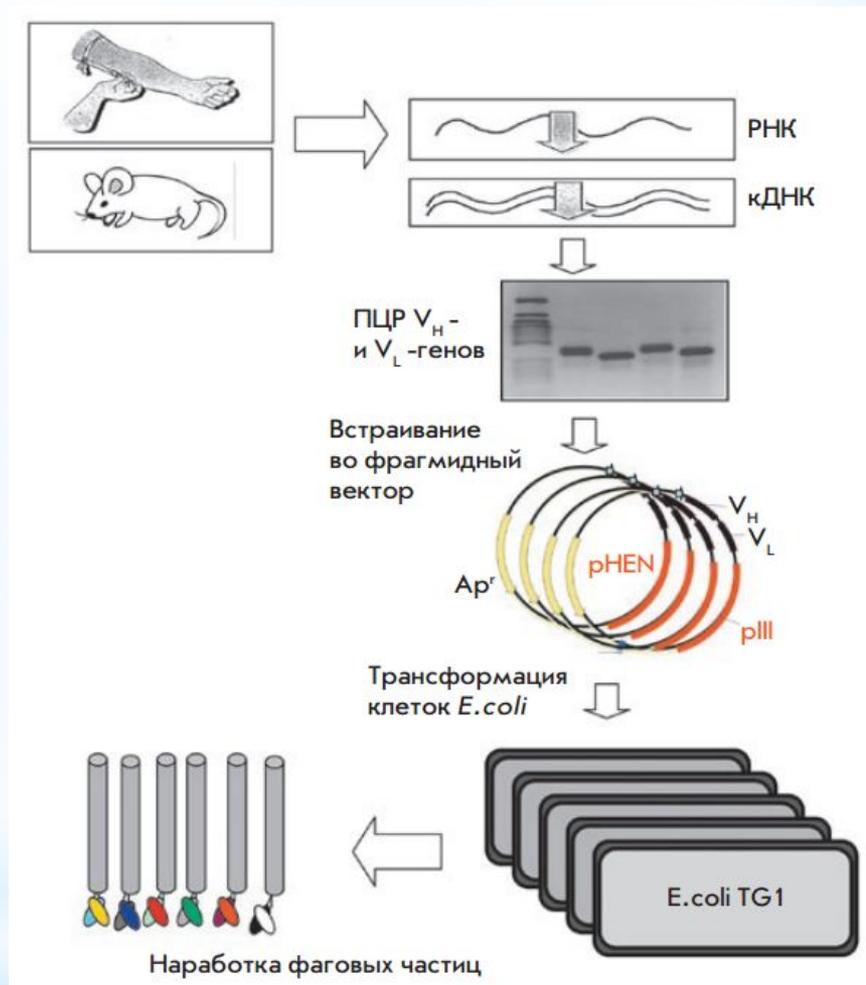


Схема конструирования фаговой библиотеки фрагментов антител

* После трансфекции *E.coli* полученным репертуаром фагмид получают библиотеку бактериофагов, каждый из которых экспонирует на поверхности индивидуальную комбинацию переменных доменов тяжелых и легких цепей. Лигирование ДНК и трансформация бактерий являются ключевыми стадиями, т.к. именно от них зависит размер получаемой библиотеки

* Характеристики библиотеки

- * Характеристика таких библиотек складывается из уровня аффинности получаемых антител, размера библиотеки и его функционального размера.

* Типы фаговых библиотек антител

* in vitro

- * «натуральные» (на основе выделенной из периферических лимфоцитов, костного мозга или селезенки мРНК, кодирующей иммуноглобулины)
- * «синтетические»

* Натуральные библиотеки антител

- * Иммунные библиотеки, сконструированные из периферических лимфоцитов людей, иммунизированных каким-либо антигеном, представляют большой интерес для медицинских исследований, т.к. в этом случае более вероятно отобрать антитела, перспективные для терапии
- * «Наивные» библиотеки, сконструированные на основе мРНК лимфоцитов неиммунизированных здоровых людей, используют для получения антител, специфически направленных к множеству антигенов, в т.ч. и к собственным аутоантигенам. Сконструированные «наивные» библиотеки в большей степени представляют исходный репертуар антител.

* Синтетические фаговые библиотеки антител делятся на две группы:

- * 1) синтетические библиотеки на основе одной коровой последовательности V-гена;
- * 2) синтетические библиотеки на основе множества коровых V-генов.

* Конструирование библиотек

* При конструировании комбинаторных библиотек антител, в зависимости от типа создаваемой библиотеки, используют различные источники генного репертуара. «Наивные» и иммунные библиотеки конструируют, используя естественным образом реорганизованные гены, кодирующие переменные домены иммуноглобулинов здоровых или иммунных к какому-либо антигену доноров, соответственно

* Существенным преимуществом иммунных библиотек является возможность отбора высокоаффинных антител, появляющихся после вирусных инфекций или рака, а также антител на аутоантигены, представленные у больных с аутоиммунными заболеваниями. Анализ таких антител может помочь в определении антигенных эпитопов, вовлеченных в гуморальный иммунный ответ. Еще одно преимущество иммунных библиотек - это возможность отбора антител против второстепенных или слабо иммуногенных антигенов.

***Аффинная селекция антител
из библиотек**

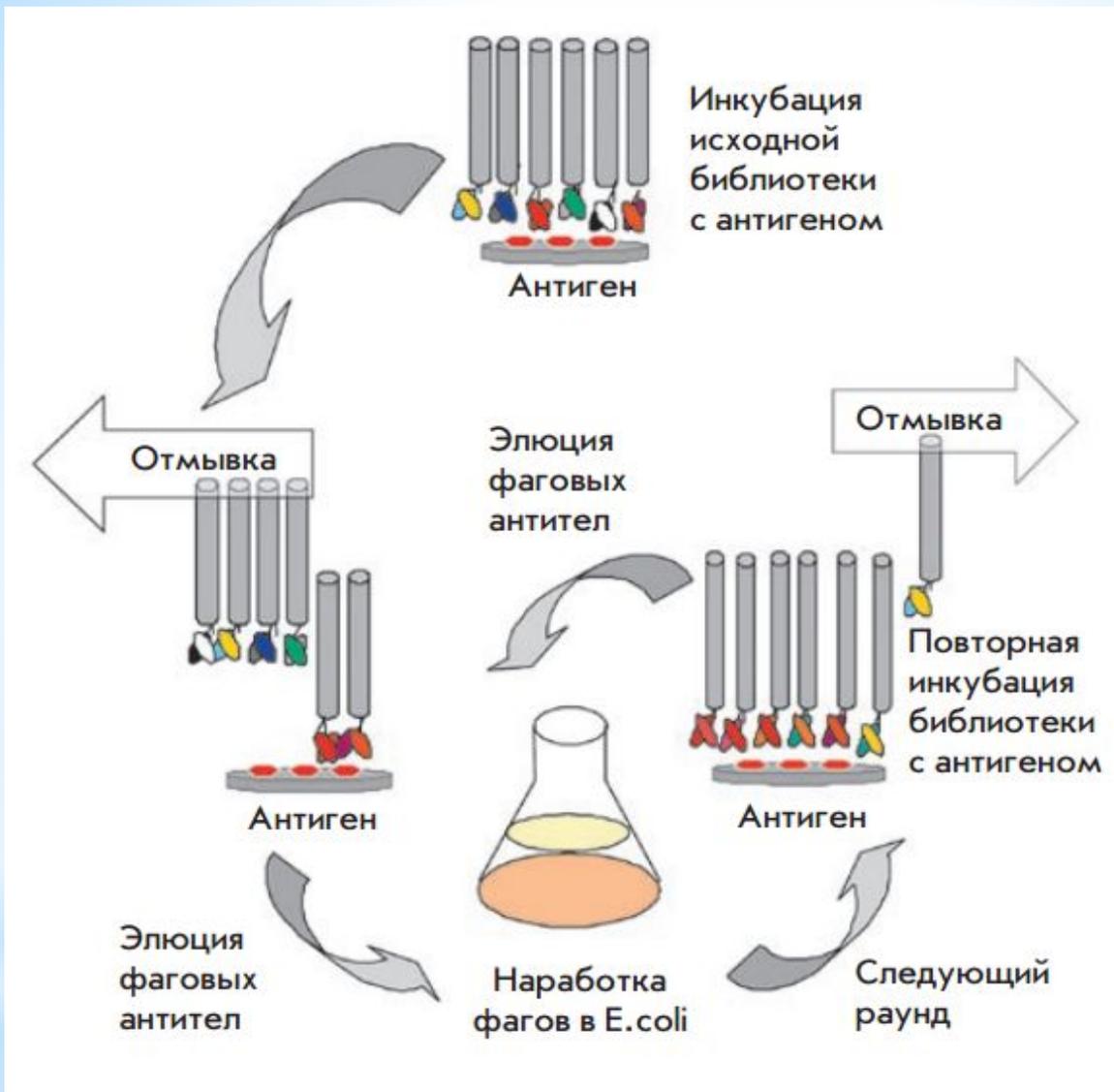


Схема процедуры биопэннинга

* Стратегии биопэннинга

- * Биопэннинг с использованием иммобилизированных антигенов.
- * Биопэннинг с использованием раствора антигена.
- * Биопэннинг на клетках.
- * Биопэннинг *in vivo*.

* Биопэннинг с использованием иммобилизированных антигенов

* Традиционно биопэннинг проводят с использованием антигена, сорбированного на пластиковой поверхности, например, иммунопробирок (Maxisorb tubes; Nalge Nunc Intl., Naperville, IL) или планшетов для ИФА

* Биопэннинг с использованием раствора антигена

- * Для того чтобы избежать нарушений конформации, используют методики, позволяющие антителу связывать антиген в растворе.
- * После инкубации антител с антигеном, пришитым к биотину, фаги, связавшиеся с мечеными антигенами, удаляют при помощи покрытых авидином или стрептавидином парамагнитных шариков. В результате специфично связавшиеся фаги отделяются от антигена и могут быть охарактеризованы.

* Биопэннинг на клетках

- * Прямой отбор антител против маркеров на клеточной поверхности может быть проведен либо на монослое клеток, либо с использованием клеточной суспензии

* Биопэннинг *in vivo*

* Этот метод предполагает введение репертуара фаговых антител непосредственно в организм животных. Затем ткани извлекают и получают фаговые антитела, связавшиеся с тканеспецифичными клеточными маркерами, аналогично тому, как это было сделано в случае пептидных библиотек

*** Проблемы и успехи дисплея
на основе
нитчатых бактериофагов**

* Проблемы

- * низкая концентрация исходных антиген специфичных лимфоцитов в популяции
- * с помощью процедуры биопэннинга трудно обогатить библиотеки антител так, чтобы впоследствии отбирать специфические антитела, обладающие высокой аффинностью
- * уменьшение доли фагов с полноразмерной вставкой в ходе наработки библиотеки
- * существуют значительные различия между теоретически возможным разнообразием, обеспечиваемым всей популяцией фагмид конкретных библиотек, и реально представленным разнообразием антител

* Плюсы

- * Отказ от лабораторных животных
- * Используя фаговые библиотеки фрагментов антител человека, можно отказаться от применения для терапии химерных или гуманизированных антител
- * Библиотеки фрагментов антител позволяют быстро изолировать специфические антиген-связывающие домены человеческого происхождения без ограничений, связанных с доступностью донорских лимфоцитов или проблемами слияния клеток
- * возможность использования одной библиотеки для неоднократного скрининга против различных антигенов
- * относительная простота в исполнении и возможность скрининга большого количества кандидатных молекул за короткий промежуток времени
- * возможность отбора антител против широкого круга антигенов, включая токсичные вещества или особо опасные вирусы, иммунизация которыми невозможна по этическим причинам

*** на фармацевтическом рынке
США продается более 14
антител,
антигенсвязывающие домены
которых получены методом
фагового дисплея**

*** Спасибо за внимание!**