

*Т.Г.Самарцева, А.С.Оксанич, Н.Ф.Гаврилова,
И.В.Яковлева, В.В.Свиридов, В.В.Зверев*

ПРИМЕНЕНИЕ УНИВЕРСАЛЬНЫХ ПЛАЗМИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ ЗАДАННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Разработка методических подходов для изменения антигенной специфичности химерных антител путем замены генов переменных областей в полученных ранее универсальных плазмидных конструкциях pLK DT-17 и pHG DT-17, кодирующих антитело против дифтерийного токсина (ДТ) DT-17, на гены антитела, связывающегося с другим эпитопом ДТ — DT-22. *Материалы и методы.* Из гибридомы, продуцирующей моноклональные антитела к ДТ DT-22, методом обратной транскрипции и ПЦР были получены гены переменных областей легких и тяжелых цепей мышинового антитела к ДТ — DT-22. Генно-инженерными методами в рекомбинантных плаزمиде pLK DT-17 и pHG DT-17, кодирующих соответственно легкую и тяжелую цепи антитела DT-17, заменяли переменные области антител DT-17 на соответствующие области DT-22. После чего получали «супервектор» pSV DT-22, содержащий гены обеих цепей химерного антитела. С использованием культуральных методов «супервектором» была трансфицирована культура клеток CHO и получен высокопродуктивный клон, секретирующий химерные антитела к ДТ. Для оценки активности антител применяли иммунохимические и культуральные методы, а для получения препаративного количества антител — аффинную хроматографию. *Результаты.* Выход очищенных химерных антител DT-22, секретируемых клоном, составил 4 мг с 1 л культуральной среды. Минимальная концентрация химерных антител, при которой наблюдалась нейтрализация ДТ в культуре клеток CHO, составила 22 мкг/мл среды. *Заключение.* Таким образом, было показано, как из сконструированных ранее универсальных рекомбинантных плазмид pLK DT-17 и pHG DT-17, кодирующих соответственно легкую и тяжелую цепи антитела к ДТ DT-17, простыми генно-инженерными методами были получены векторы, кодирующие синтез легкой и тяжелой цепей химерного антитела DT-22, специфичного к другому эпитопу ДТ.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 32—39

Ключевые слова: иммуноглобулиновые гены, «супервектор», рекомбинантные антитела, дифтерийный токсин, токсиннейтрализующая активность, клонирование, трансфекция, культура клеток CHO

*T.G.Samartseva, A.S.Oksanich, N.F.Gavrilova,
I.V.Yakovleva, V.V.Sviridov, V.V.Zverev*

USING OF UNIVERSAL PLASMID CONSTRUCTIONS FOR DESIGN OF RECOMBINANT ANTIBODIES WITH DEFINED SPECIFICITY IN EUKARYOTIC CELLS

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. In this study we aimed to develop the methodology to change the antigen specificity of chimeric antibodies by replacing the variable region genes in the previously designed universal plasmid constructions pLK DT-17 and pHG DT-17 encoding the DT-17 antibody against the diphtheria toxin (DT) to the genes of antibody binding to another DT epitope — DT-22. *Materials and methods.* The genes of the light and heavy chain variable regions of mouse anti-DT antibodies — DT-22 were amplified from the hybridoma producing monoclonal antibodies to DT by reverse transcription and PCR methods. Genetic engineering methods were used to replace the variable regions of DT-17 antibody in the recombinant plasmids pLK DT-17 and pHG DT-17 encoding the light and heavy chains of DT-17 antibody, respectively to the relevant genes of DT-22. Subsequently, a «supervector» pSV DT-22, containing the genes of both chains of the chimeric

antibody, was designed. CHO cells were transfected with a «supervector» and a highly productive clone, secreting chimeric antibodies to DT was obtained. Immunochemical and cultural methods were used to evaluate antibody activity. The affinity chromatography was used to purified preparative amounts of antibodies. *Results.* The yield of purified secreted chimeric DT-22 antibodies was 4 mg from per liter of culture medium. The minimum concentration of chimeric antibodies at which DT was neutralized in the CHO cells was 22 µg/mL of medium. *Conclusion.* Thus it has been shown how to generate new vector coding synthesis of light and heavy chains of a chimeric DT-22 antibody specific to another DT epitope using previously constructed universal recombinant plasmids pLK DT-17 and pHG DT-17 encoding, light and heavy chains of antibodies against DT DT-17, respectively.

Zh.Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 32—39

Key words: immunoglobulin genes, «supervector», recombinant antibodies, diphtheria toxin, toxin neutralizing activity, cloning, transfection, CHO cells

ВВЕДЕНИЕ

Для защиты от чужеродных патогенов иммунная система позвоночных постоянно вырабатывает молекулы иммуноглобулинов. Они представляют собой сложные белковые молекулы, которые способны идентифицировать и нейтрализовать антигены, такие как бактерии, вирусы, токсины, яды и др.

Чаще всего для получения антител используют донорскую кровь и кровь иммунизированных животных, но их применение ограничивают различные факторы. Для человеческих антисывороток существует дефицит сырьевой базы донорских сывороток, имеет место сложность стандартизации, а также риск заражения пациента редкими патогенами, например, малоизученными вирусами или прионами. Антисыворотки, полученные от животных, вызывают различные побочные эффекты в виде аллергических реакций вплоть до анафилактического шока или образование собственных антител к белкам сыворотки животного, что существенно снижает эффективность препаратов животного происхождения при длительной терапии [7].

В 1975 году Кёлер и Мильштейн разработали процедуру эффективного производства мышиных моноклональных антител желаемой антигенной специфичности, что положило начало развитию гибридомной технологии [6]. Полученные мышиные антитела не взаимодействовали должным образом с компонентами иммунной системы человека, и их использование было строго ограничено.

Достижения в области молекулярной биологии способствовали развитию генетической инженерии, целью которой было создание на основе генов иммуноглобулинов плазмидных конструкций, кодирующих рекомбинантные антитела с заданными свойствами. В зависимости от поставленной задачи стало возможным изменение размеров антител, их специфичности, аффинности, валентности. Открылись перспективы получения мини-антител, химерных и гуманизированных антител, которые широко используются в научных исследованиях и медицине [2].

В настоящее время для клинического применения зарегистрированы более 30 препаратов на основе рекомбинантных антител. Из них около 90% предназначены для лечения онкологических заболеваний, например, рака молочной железы, рака кишечника, В-клеточной лимфоцитарной лейкемии, Неходжкинской лимфомы, миелолейкоза и др. Также антитела используют в

трансплантологии, для лечения сердечно-сосудистых, аутоиммунных и, в редких случаях, инфекционных заболеваний [1].

В основе рекомбинантных антител, применяемых в терапии заболеваний человека, лежат генетические конструкции в виде плазмидных векторов, адаптированных для эукариотических систем экспрессии, которые чаще всего создаются под конкретное антитело каждый раз заново, что увеличивает стоимость разработки новых конструкций и повышает трудовые и временные затраты [5, 8]. Ранее были сконструированы и синтезированы последовательности генов легкой и тяжелой цепей химерного антитела, нейтрализующего дифтерийный токсин — DT-17, которые были клонированы в эукариотическом векторе pCI-neo («Promega», США) [3]. Нуклеотидные последовательности генов переменных областей были получены из мышинной гибридомы, секретирующей моноклональные антитела DT-17. Особенность сконструированных плазмидных векторов была в том, что каждый фрагмент гена: лидерная, переменная и константная области были фланкированы сайтами редкощепящих эндонуклеаз рестрикции. Таким образом, были созданы конструкции, которые потенциально позволяют заменять гены переменных и константных областей с целью получения антител другой специфичности, другого класса или видовой принадлежности. Ранее нами также была получена мышинная гибридома DT-22, продуцирующая антитела к другому эпитопу дифтерийного токсина (ДТ), чем DT-17 и также обладающая токсиннейтрализующей активностью.

Целью настоящей работы было получение плазмидных конструкций, кодирующих химерные моноклональные антитела к дифтерийному токсину (ДТ) DT-22, на основе полученных ранее универсальных векторов pLK DT-17 и pHG DT-17, кодирующих химерные антитела к ДТ DT-17, но связывающихся с другим эпитопом, путем замены в векторах генов переменных областей DT-17 на переменные области DT-22.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовалась гибридома DT-22, продуцирующая моноклональные антитела, которые обладают нейтрализующей активностью в отношении дифтерийного токсина.

Гибридомы-продуценты антител к дифтерийному токсину культивировали на среде RPMI 1640 с добавлением 10% сыворотки плода коровы и глутамина. После восстановления криоконсервированных гибридных клонов перед выделением из них мРНК их культивировали при 37°C в CO₂ инкубаторе в течение нескольких суток. Морфологию клеток оценивали под инвертированным микроскопом, их антитело-образующую способность и активность антител в культуральной среде — в ИФА. При сохранности специфичных для каждого клона характеристик, клетки, взятые на стадии экспоненциального роста, осаждали центрифугированием; осадок клеток использовали для выделения суммарной РНК с использованием набора реагентов RNeasy Mini Kit («Qiagen», Германия).

Праймеры для амплификации участков генов, кодирующих переменные фрагменты тяжелой и легкой цепей мышинных IgG, подбирали, руководствуясь [4]. Олигонуклеотиды синтезировали в компании «Синтол» (Россия).

Получение кДНК в реакции обратной транскрипции (ОТ), амплификацию доменов переменных участков иммуноглобулинов мыши, а также встраивание их в плазмиду, секвенирование ампликонов и плазмиды для контроля

правильности полученной конструкции проводили в соответствии со стандартными методами генной инженерии.

Культуру клеток СНО культивировали на питательных средах RPMI («Панэко», Россия) или Opti-MEM («Invitrogen», США) с добавлением и без добавления фетальной бычьей сыворотки («Gibco», США) в количестве 2,5-5%. Для трансфекции клеток использовали реактив Lipofectamine 2000 («Invitrogen», США) согласно рекомендациям производителя, а для аффинной очистки иммуноглобулинов — протеин-G сефарозу («Биалекса», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из гибридомы DT-22, продуцирующей моноклональные антитела к дифтерийному токсину, выделяли суммарную РНК, в реакции ОТ получали кДНК с использованием олиготимидинового праймера T18. Для амплификации генов вариабельных областей легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина G мыши использовали универсальные праймеры, описанные в [4]. Полученные ПЦР-продукты секвенировали. На основе нуклеотидных последовательностей вариабельных генов легкой (L) и тяжелой (H)-цепей были подобраны праймеры, которые на 5'-концах содержали «довески», включающие в себя сайты рестрикции для клонирования в векторы pLK DT-17 и pHG DT-17, полученные ранее и содержащие гены химерного антитела к ДТ (DT-17), направленного к другому эпитопу токсина [3]. Полученные таким образом ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазами NruI и Bsp13I («СибЭнзим», Россия) для клонирования вариабельной области тяжелой цепи антитела DT-22 в вектор pHG DT-17 и EgeI, Sfr274I («СибЭнзим», Россия) для клонирования вариабельной области легкой цепи каппа в вектор pLK DT-17 (рис. 1). Соответствующими рестриктазами также обрабатывали векторы, избавляясь от вырезаемых вставок L и H-цепей вариабельных областей DT-17. Для этого обработанные рестриктазами векторы разделяли в агарозном геле, а затем вырезали из геля высокомолекулярные фрагменты, представляющие собой плазмидные векторы без вариабельных участков антител DT-17. Затем проводили лигирование вектора с подготовленными ПЦР-продуктами.

Так как векторные конструкции pLK DT-17 и pHG DT-17 уже содержали в своем составе нуклеотидные последовательности константных областей иммуноглобулина G человека, то их клонировать не требовалось.

Для анализа работоспособности полученных рекомбинантных векторов pLK DT-22 и pHG DT-22 в эукариотической системе ими была проведена трансфекция клеток СНО. При проведении трансфекции по отдельности и ко-трансфекции обеими плазмидами был использован реагент для трансфекции Lipofectamine 2000 («Invitrogen», США), согласно инструкции производителя. Одновременно с трансфекцией был произведен контроль эффективности трансфекции плазмидой pTurboRFP-C («Евроген», Россия). На третьи сутки после трансфекции культуральную жидкость отбирали в отдельные пробирки и центрифугировали. Полученные осветленные образцы анализировали методом ИФА. На поверхности планшетов для ИФА был адсорбирован дифтерийный анатоксин. Планшеты обрабатывали 2-кратными разведениями препаратов, полученных в результате трансфекции в трех повторах. После инкубации планшеты промывали и инкубировали с пероксидазным конъюгатом, специфичным к Fc-фрагментам человеческих иммуноглобулинов G, реакцию проявляли ТМВ.

Исследования показали, что в культуральной жидкости после временной

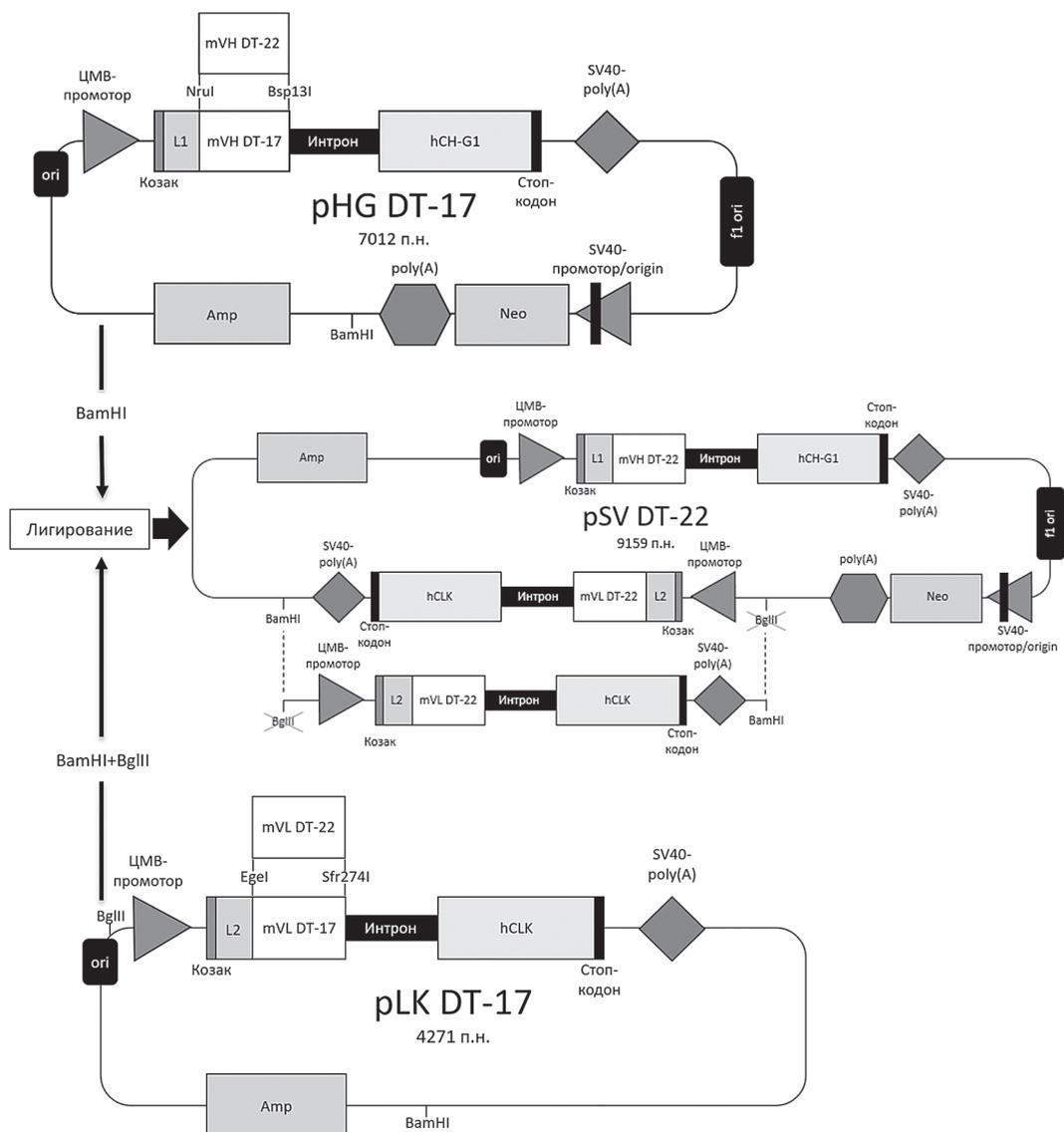


Рис. 1. Схема получения «супервектора» pSV DT-22.

L1, L2 — лидерные последовательности, mVH и mVL — гены мышиных варибельных областей тяжелой и легкой цепи соответственно, hCH, hCLK — человеческая константная область тяжелой и легкой цепи каппа соответственно, SV-40 poly(A) — сайт полиаденилирования вируса SV-40, Amp — ген устойчивости к ампициллину (β -лактамаза), Neo — ген устойчивости к неомицину (неомицин фосфотрансфераза).

трансфекции обеими плазмидами накапливались антитела, специфичные к дифтерийному анатоксину. Титры антител составили 1:64. В то же время, достоверной разницы в оптической плотности по результатам ИФА между отрицательным контролем — СНО, трансфицированные pTurboRFP-C, образцами культуральной жидкости от нетрансфицированных клеток и в препаратах, полученных в результате трансфекции каждой плазмидой по отдельности, выявлено не было. Таким образом, было установлено, что только при одновременной трансфекции плазмидами, содержащими L и H-цепи DT-22, детектировалось накопление специфичных антител в супернатантах клеток.

На следующем этапе из двух рекомбинантных плазмид, кодирующих нуклеотидные последовательности легкой (pLK DT-22) и тяжелой (pHG DT-22) цепей химерного антитела к ДТ, был получен супервектор pSV DT-22, объединяющий эти гены в одной плазмидной конструкции. Для этого вектор pLK DT-22 обрабатывали рестриктазами BamHI и BglII, и фрагмент, содержащий нуклеотидные последовательности варибельной и константной областей легкой цепи химерного антитела, вырезали из геля и очищали с помощью специализированного набора реагентов («Евроген», Россия). Вектор pHG DT-22 обрабатывали рестриктазой BamHI. Подготовленные таким образом векторы лигировали с помощью T4 ДНК-лигазы («СибЭнзим», Россия). Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* штамм XL1-Blue. Клоны бактерий для накопления плазмиды отбирали на основании рестрикционного анализа плазмид выделенных из отдельных колоний с использованием коммерческого набора фирмы «ZymoResearch» (США) — ZR Plasmid Miniprep. Отобранные плазмиды секвенировали и использовали для трансфекции клеток СНО с целью получения стабильно трансфицированной культуры клеток. Стабильно трансфицированную культуру клеток СНО получали методом выращивания клеток в токсичной дозе антибиотика G418 в течение 14 дней.

Химерные антитела к дифтерийному токсину, полученные в результате временной и стабильной трансфекции «супервектором» pSV DT-22, были проанализированы в реакции ИФА. При временной трансфекции титр специфических антител против ДТ составил 1:128, а при стабильной — 1:16.

Из стабильно-трансфицированной культуры были получены 40 клонов, самый продуктивный из которых секретировал антитела в титре 1:1024, что в 64 раза больше по сравнению с исходной стабильно трансфицированной культурой СНО.

Для оценки выхода антител от высокопродуктивного клона собранную на 4 сутки культуральную среду центрифугировали для избавления от дебриса и клеток, а супернатант собирали для аффинного выделения химерных антител к ДТ на протеин-G сефарозе. Выход антител в элюате составил около 4 мг с каждого литра культуральной среды (рис. 2).

Сконцентрированные антитела диализовали, проводили стерилизующую фильтрацию через фильтр с мембраной PES и диаметром пор 0,2 мкм и использовали для оценки токсиннейтрализующей активности в реакции нейтрализации ДТ в культуре клеток СНО (табл.).

Оценку токсиннейтрализующей активности химерных антител DT-22 проводили в 96-луночном планшете. Для этого готовили 2-кратные разведения химерных антител и вносили препараты в лунки в объеме 100 мкл/лунку, после чего добавляли в каждую лунку по 4 цитотоксические дозы ДТ (0,0025 Lf/мл) в объеме 50 мкл и 100 мкл среды RPMI-1640. Далее вносили по 100 мкл суспензии предварительно снятых 0,25% раствором трипсина-ЭДТА и отмытых центрифугированием клеток СНО в концентрации 10^6 клеток на планшет



Рис. 2. Электрофорез аффинно очищенных химерных антител DT-22 в ПААГ. Неденатурирующие условия, окрашивание Кумасси; DT-22 — аффинно очищенные химерные антитела DT-22 (клон DT-22-7-C20).

(10^4 на лунку). Планшет помещали в CO_2 инкубатор при 37°C . Для контроля брали стандартную противодифтерийную сыворотку, которую также титровали с 2-кратным шагом, начиная с 0,01 МЕ/мл. Учет результатов реакции проводили через 48 час под микроскопом и через 72 часа — колориметрически. Закисление среды свидетельствовало о пролиферации клеток в лунках с полностью нейтрализованным исследуемыми препаратами ДТ. В результате нейтрализующая активность химерных антител ДТ-22 с дифтерийным токсином в культуре клеток СНО наблюдалась при концентрации антител 22 мкг/мл.

Таким образом, общепринятыми молекулярно-биологическими и генно-инженерными методами были получены рекомбинантные векторы pLK DT-22 и pHG DT-22, кодирующие соответственно вариабельные области легкой и тяжелой цепей химерного антитела ДТ-22. Векторные конструкции были спроектированы таким образом, чтобы не требовалось при изменении специфичности антител синтезировать гены вариабельных участков легкой и тяжелой цепей, а достаточно было получить ПЦР-продукты генов Н и L-цепей с «довесками», содержащими сайты рестрикции для клонирования в универсальный вектор.

Для получения «супервектора» pSV DT-22 вектор pLK DT-22 обрабатывали рестриктазами BamHI ($G^{\wedge}GATCC$) и BglII ($A^{\wedge}GATCT$), а pHG DT-22 — только BamHI. Особенность данного подхода в том, что «липкие» фрагменты, получаемые при рестрикции вектора pLK DT-22 двумя разными рестриктазами, одинаковые — GATC. Таким образом, лигирование гена легкой цепи в pHG DT-22 может происходить как в прямой, так и в обратной ориентации, при этом в зависимости от ориентации сайт рестрикции BamHI может менять локализацию, в то же время, сайт рестрикции BglII пропадает при любой ориентации гена легкой цепи. Эта особенность позволяет рестрикционным анализом оценивать ориентацию встраиваемого гена. Нами были получены оба варианта «супервекторов». Достоверной разницы в выходе специфических антител к ДТ в культуре клеток СНО в зависимости от ориентации генов относительно друг друга при временной трансфекции выявлено не было.

«Супервектор» pSV DT-22 содержит ген устойчивости к антибиотику G418, что позволило использовать его для получения стабильно трансфицированной культуры клеток и последующего клонирования. С целью увеличения выхода целевого продукта из стабильно трансфицированной культуры клеток СНО был выделен высокопродуктивный клон ДТ-22-7-С20, его продуктивность в 64 раза превышала выход специфических антител из исходной культуры клеток. Экспериментально показано, что получаемые антитела являются химерными, то есть содержат мышинные антиген-распознающие вариабельные фрагменты и человеческий Fc-фрагмент, они секретируются из клеток и обладают специфичностью к дифтерийному токсину/анатоксину.

Оценка активности химерных антител ДТ-22 в ИФА на разных стадиях очистки

Разведение химерных антител	Оптическая плотность в ИФА при 450 нм \pm Sd	
	после диализа	после фильтрации
1:100	5,303 \pm 0,132	4,88 \pm 0,102
1:200	4,457 \pm 0,017	3,706 \pm 0,127
1:400	3,087 \pm 0,135	2,267 \pm 0,044
1:800	1,766 \pm 0,096	1,218 \pm 0,108
1:1600	0,849 \pm 0,026	0,711 \pm 0,048
1:3200	0,512 \pm 0,054	0,395 \pm 0,006
1:6400	0,347 \pm 0,008	0,300 \pm 0,010
1:12800	0,223 \pm 0,007	0,224 \pm 0,014
Исх. среда 1:10		2,102 \pm 0,096
К-		0,049 \pm 0,031

Примечание. Sd — стандартное отклонение.

Перед оценкой токсиннейтрализующей активности химерных антител их предварительно очищали с использованием аффинной очистки на протеин-G сефарозе. После чего проводили диализ и фильтрацию через фильтр с мембраной PES и размером пор 0,2 мкм, на каждом этапе полученный материал анализировали в ИФА. Очистка и концентрирование антител имели решающее значение, так как низкая концентрация антител в образце не позволяла определить их токсиннейтрализующие свойства.

Показано, что применение аффинной очистки увеличивает титр антител с 1:1024 до 1:12800. При этом некоторое количество антител теряется при фильтрации, хотя PES мембрана обладает пониженной белковой сорбцией.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-15-01525.

ЛИТЕРАТУРА

1. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения. Acta Naturae. 2009, 1: 32-50.
2. Деев С.М., Лебеденко Е.Н., Петровская Л.Е., Долгих Д.А., Габибов А.Г., Кирпичников М.П. Неприродные антитела и иммуноконъюгаты с заданными свойствами: оптимизация функций через направленное изменение структуры. Успехи химии. 2015, 84 (1): 1-26.
3. Оксанич А.С., Самарцева Т.Г., Файзулов Е.Б., Гаврилова Н.Ф., Яковлева И.В., Свиридов В.В., Зверев В.В. Конструирование плазмидного вектора для получения химерных антител заданной специфичности в клетках млекопитающих. Журн. микробиол. 2017, 6: 56-63.
4. Imai S., Mukai Y., Nagano K. et al. Quality enhancement of the non-immune phage scFv library to isolate effective antibodies. Biol. Pharm. Bull. 2006, 29 (7): 1325-1330.
5. Khan K.H. Gene expression in Mammalian cells and its applications. Adv. Pharm. Bull. 2013, 3 (2): 257-263.
6. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975, 256 (5517): 495-497.
7. Maynard J., Georgiou G. Antibody engineering. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2000, 2:339-376.
8. Nishimiya D. Proteins improving recombinant antibody production in mammalian cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014, 98 (3): 1031-1042.

Поступила 25.12.17

Контактная информация: Самарцева Т.Г.,
105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00
