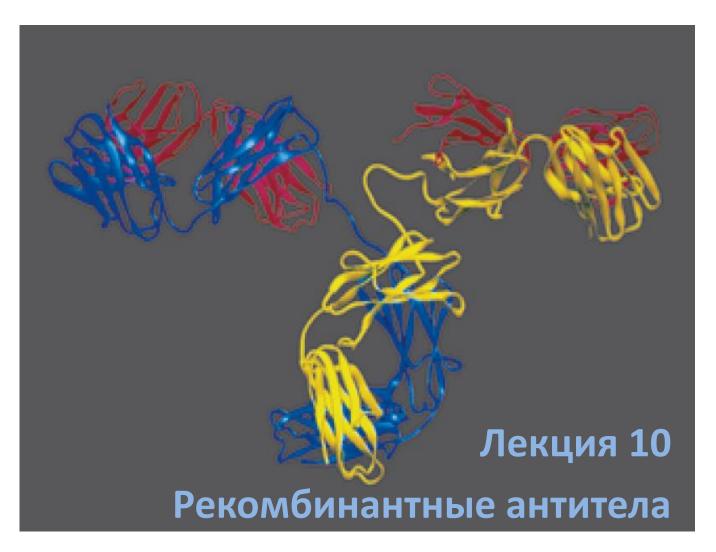
Основы генной инженерии и биотехнологии

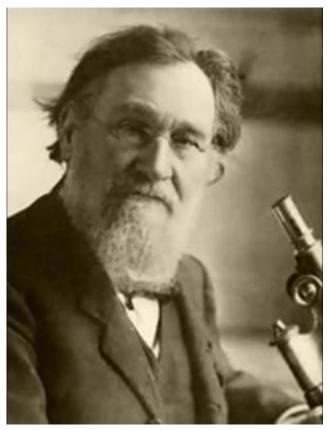


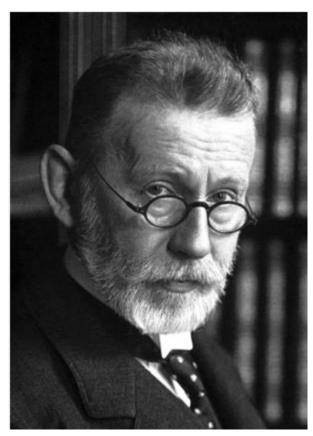
Пауль Эрлих Paul Ehrlich 1854-1915

Нобелевская

Илья Ильич Мечников 1845-1916

премия 1908





Клетки, ответственные за иммунные реакции, имеют на поверхности антигенраспознающие структуры — рецепторы. Магическая пуля

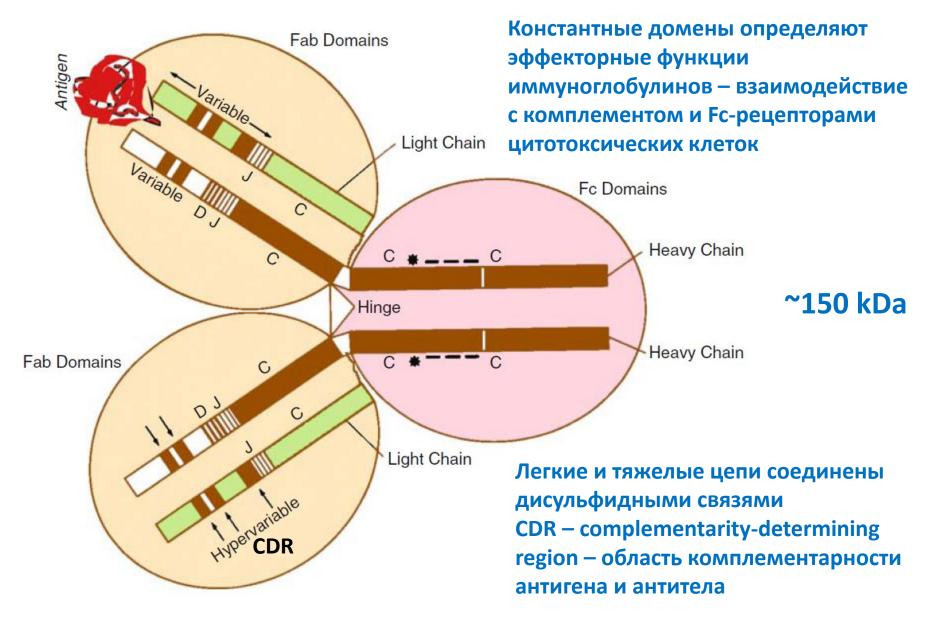
Фагоцитарная теория иммунитета



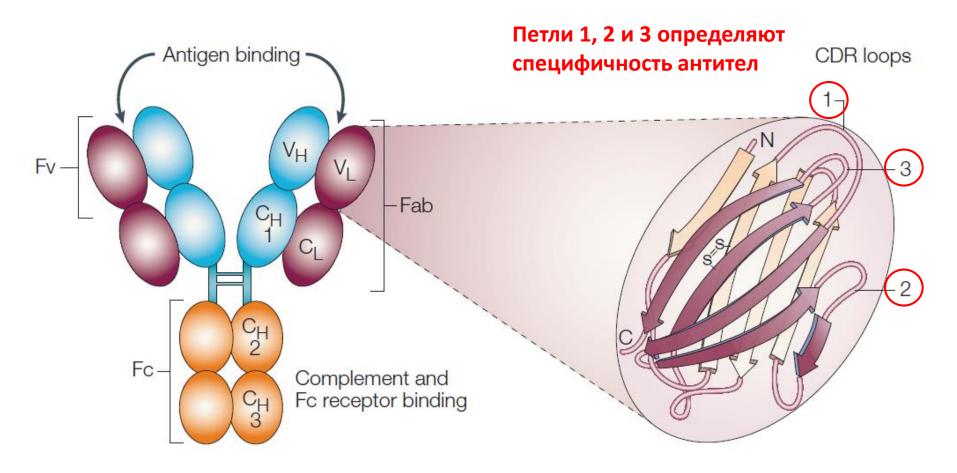
Антитела в современном мире

- **❖**Более 10 000 антител имеется на рынке
- ❖Более 30 лекарственных препаратов, основанных на антителах используется в клинической практике для лечения рака и аутоиммунных заболеваний
- ❖Более 100 препаратов с антителами проходят клинические испытания
- ❖Рынок моноклональных антител в 2017 г. более \$85 млрд. (Более половины выручки от продуктов белковой инженерии)

Строение молекулы иммуноглобулина

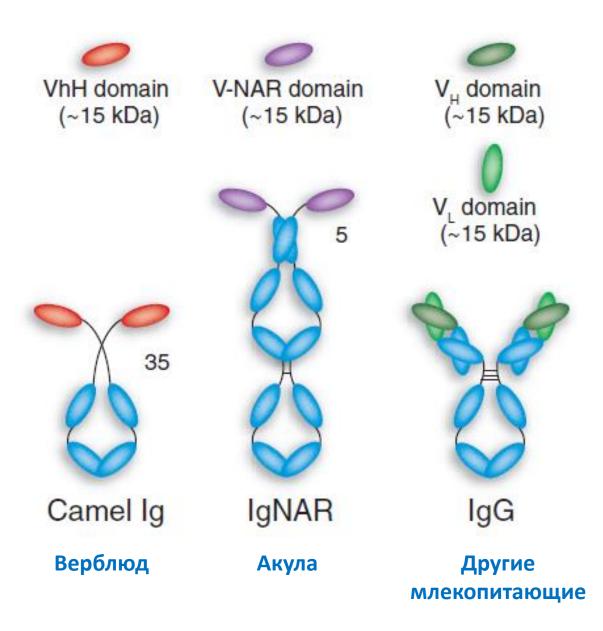


Структура вариабельной области иммуноглобулинов



CDR - complementarity-determining regions — Области, определяющие комплементарность . CDR-петли 1, 2 и 3 интегрированы в три антипараллельных β-слоя полипептидной цепи

Интактные иммуноглобулины разных животных



Иммуноглобулиноподобные белки верблюда и акулы состоят из двух аналогов тяжелых цепей

Два вариабельных участка связывают антиген независимо и являются основой получения генно-инженерных наноантител

Количественная оценка качества антител

Аффинность (K_A): сила взаимодействия антигена и антитела в растворе:

$$K_A = \frac{[Ab \bullet Ag]}{[Ab][Ag]}$$

Для моноклональных антител значения K_A находятся в пределах $10^5 - 10^{12} \ {\rm M}^{-1}$

Авидность: общая стабильность комплекса.

Определяется аффинностью, валентностью антигена и антитела, особенностями пространственной структуры антигена

Специфичность: способность к перекрестным иммунологическим реакциям

Развитие В-клеток в костном мозге млекопитающих

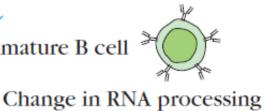
Complete heavy-chain gene rearrangement

Pre-B cell

μ Heavy chain + surrogate light chain

Light-chain gene rearrangement

Immature B cell



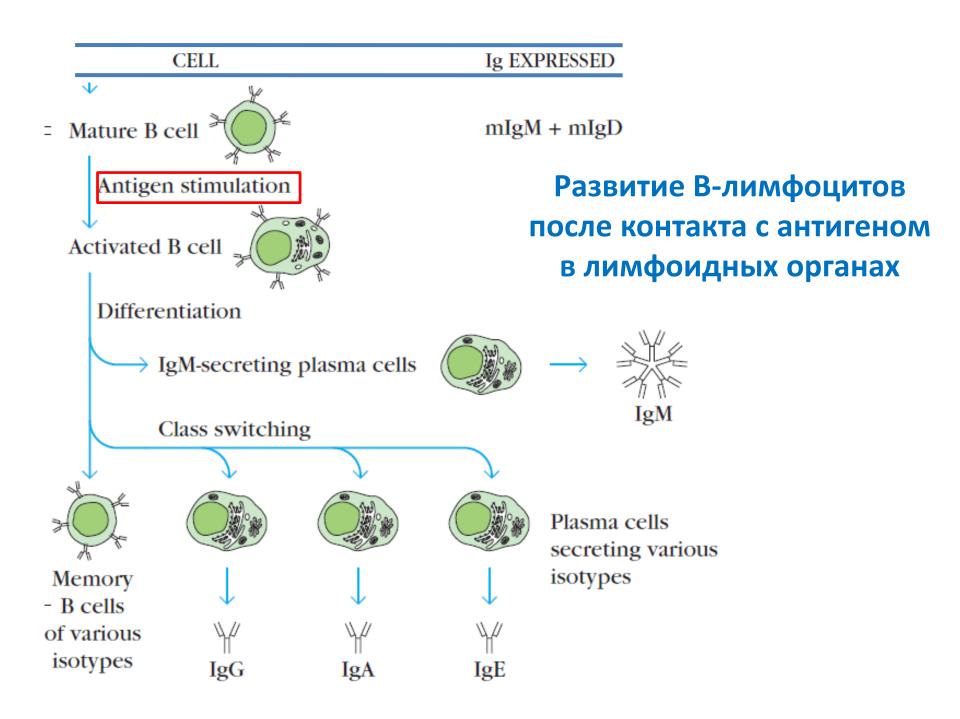
mIgM

Дифференцировка клеток происходит в отсутствие антигена

Mature B cell



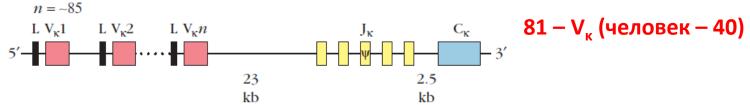
mIgM + mIgD



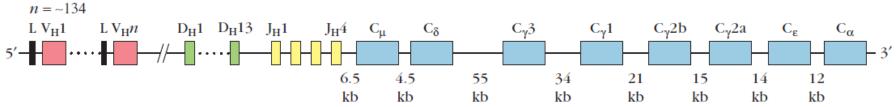
Организация генов иммуноглобулинов мыши в клетках зародышевой линии

(a) λ-chain DNA $3 - V_{\lambda}$ (человек – 31) L $V_{\lambda}2$ $L V_{\lambda} 1$ $J_{\lambda}3$ $C_{\lambda}3$ $J_{\lambda}1$ $J_{\lambda}2$ C_{λ}^2 $C_{\lambda}4$ $J_{\lambda}4$ 1.2 2.0 1.3 1.7 1.3 70 19 1.4 kb kb kb kb kb kb kb kb

(b) κ-chain DNA

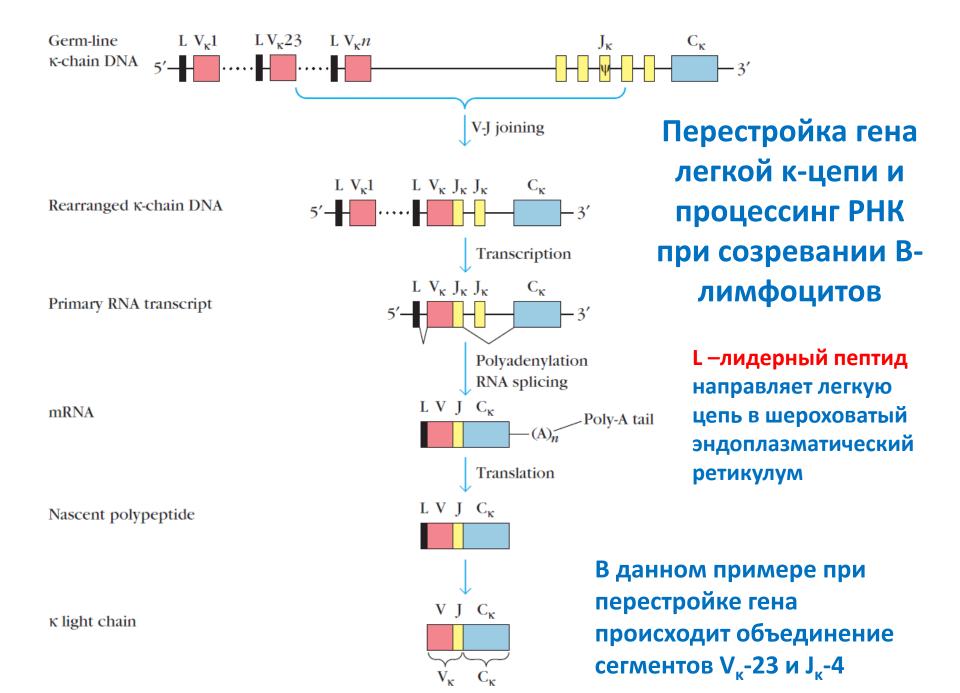


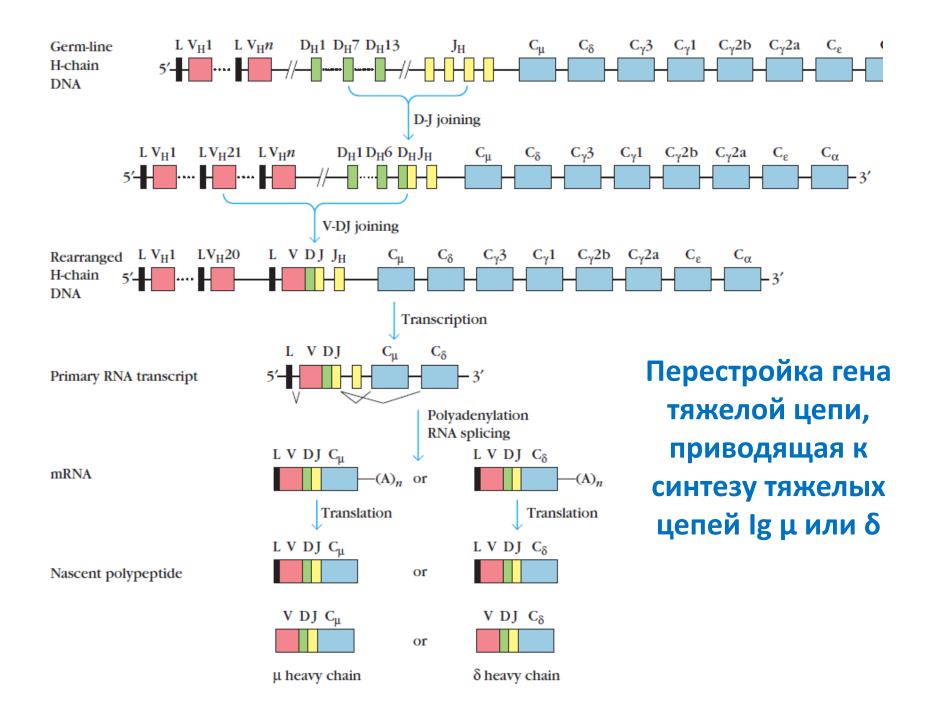
(c) Heavy-chain DNA



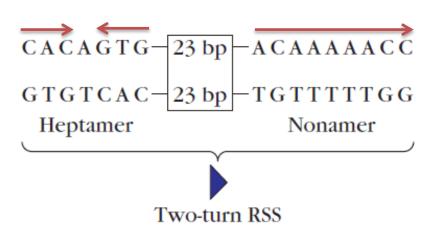
Вариабельная область тяжелых цепей кодируется тремя сегментами генов — V, D и J

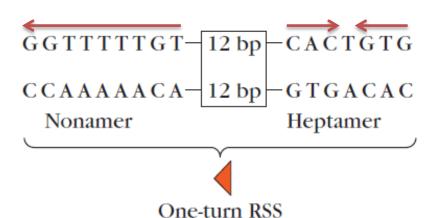
Мультигенные семейства J – joining,





Перестройки генов определяет сайт-специфическая рекомбинация



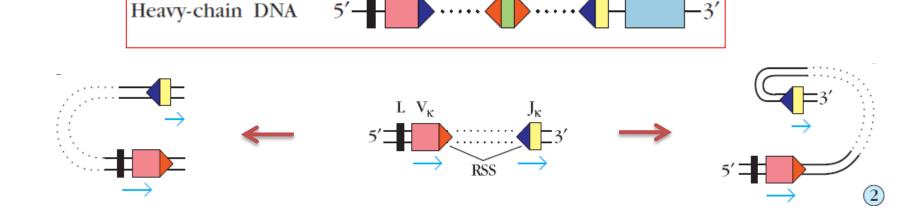


 C_{H}

Jн

RSS – recombination signal sequences

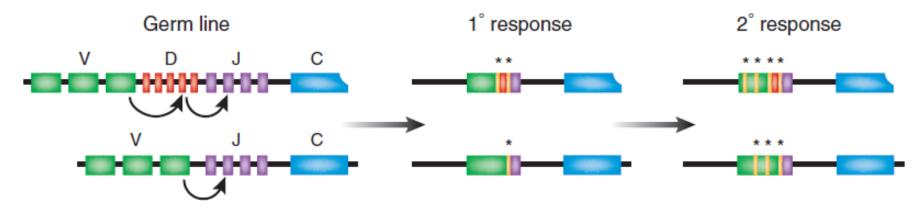
V(D)J-рекомбиназа и TdT



 $L V_H$

 D_{H}

Репертуар антител формируют три источника генетического разнообразия



Combinatorial library of V, D and J segments Junctional diversity from nucleotide addition and deletion Somatic mutation and affinity maturation

Комбинаторное объединение V-, D- и J-сегментов генов иммуноглобулинов

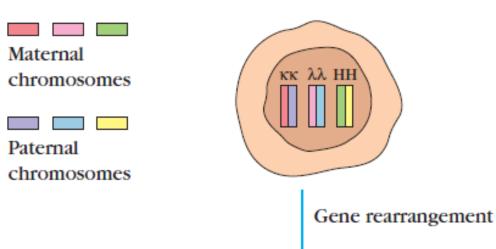
Добавление и удаление нуклеотидов на стыке сегментов генов Соматические мутации и аффинное созревание антител

Activation-Induced (Cytidine) Deaminase (AID) C → U

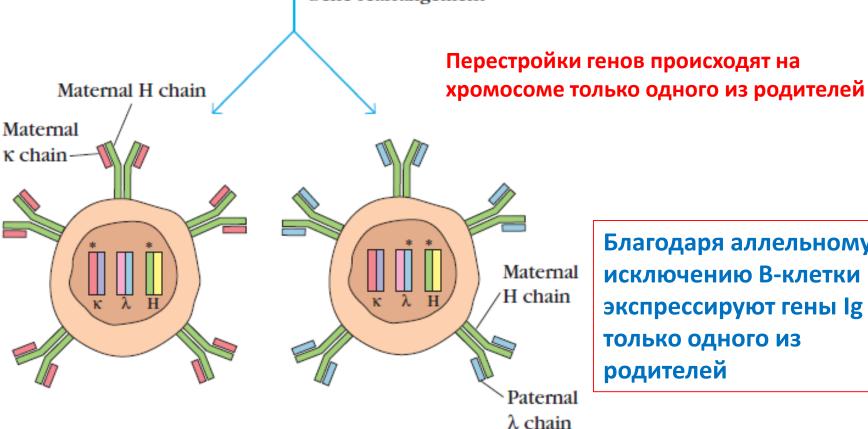
Комбинаторное разнообразие антител человека

		LIGHT CHAINS	
Multiple germ-line segments	Heavy chain	К	λ
ES	TIMATED NUMBER OF SEGME	NTS IN HUMANS*	
V	51	40	30
D	27	0	0
J	6	5	4
Combinatorial V-D-J and V-J joining (possible number of combinations)	51 × 27 × 6 = 8262	40 × 5 = 200	30 × 4 = 120
Possible combinatorial associations of heavy and light chains†		$8262 \times (200 \times 120) = 2.64 \times 10^6$	

Соматические гипермутации в вариабельных сегментах генов многократно повышают разнообразие антител



Аллельное исключение генов тяжелой и легкой цепей Ig



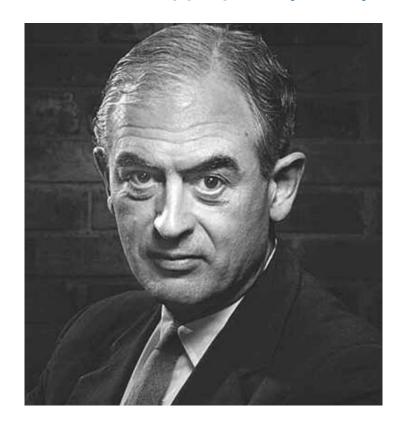
Благодаря аллельному исключению В-клетки экспрессируют гены lg только одного из родителей

Нобелевская премия по физиологии и медицине (1960)



Сэр Фрэнк Макфарлейн Бёрнет Frank Macfarlane Burnet 1899-1985

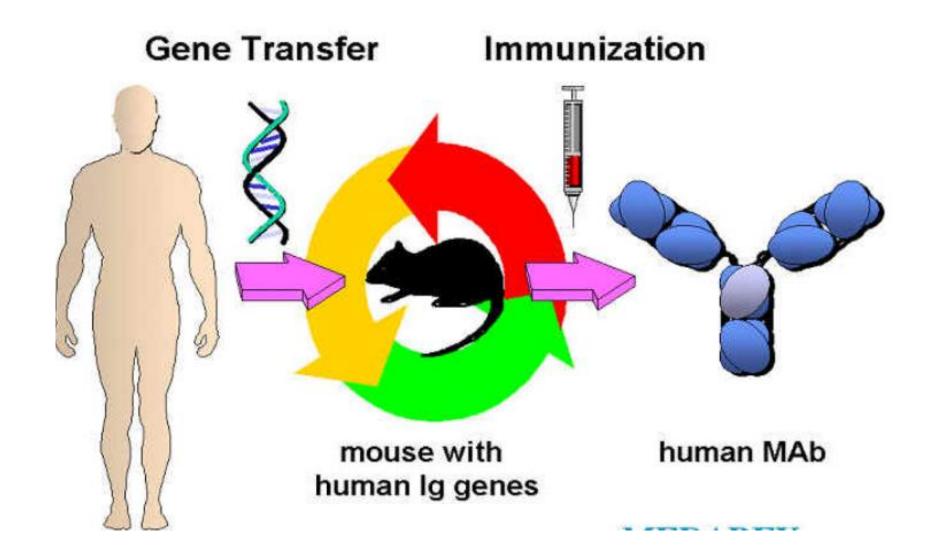
Автор клонально-селективной теории иммунитета и первооткрыватель явления иммунотолерантности



Питер Брайан МЕДАВАР Medawar 1915-1987

Открытие приобретенной иммунотолерантности, пересадка тканей

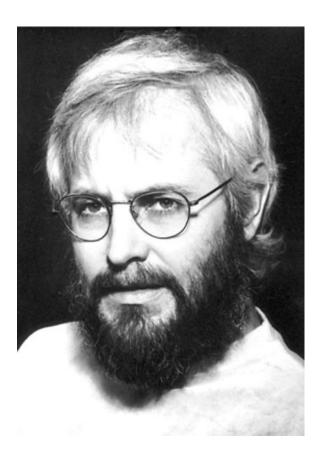
Поликлональные, моноклональные и генно-инженерные антитела



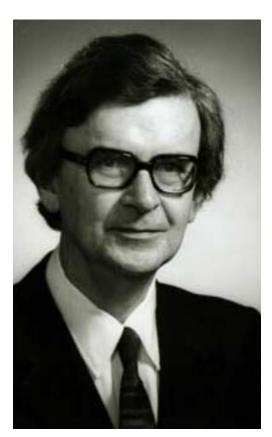
Нобелевская премия по физиологии и медицине 1984 г. за получение моноклональных антител



César Milstein 1927-2002

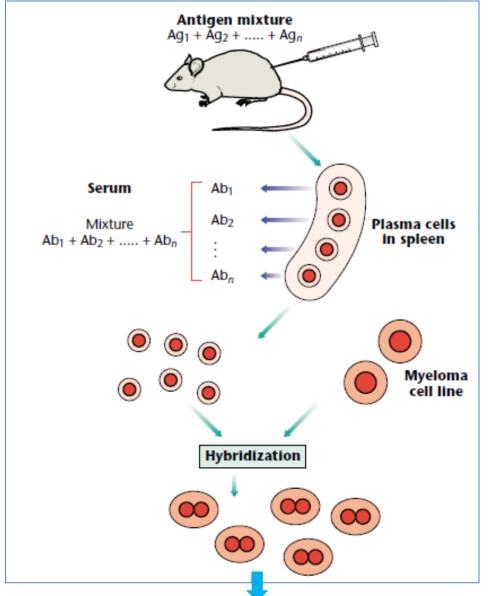


Georges J.F. Köhler 1946-1995

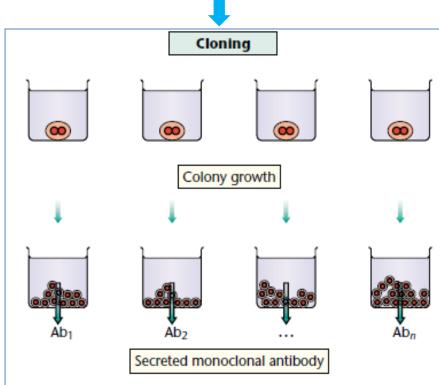


Niels Kaj Jerne 1911-1994

Получение моноклональных антител



Мышь иммунизируют набором антигенов, плазматические клетки селезенки сливают с миеломными клетками и получают клоны отдельных гибридных клеток (гибридом), секретирующих индивидуальные антитела



Три наиболее продаваемых моноклональных антитела в 2008-2010 г.г.

Generic Name Target	Brand ® FDA Approval	Companies	Indication	Sales \$ billion 2008 2009 2010
Infliximab с TNFα Фактор некроза опухолей, провоспалительный цитокин	Remicade 1998	J&J, Merck Mitsubishi Tanabe	CD, UC, AS RA, Ps, PsA	6.5 6.91 8.0
Bevacizumab VEGF hz Фактор роста эндотелия сосудов	Avastin 2004	Roche	mBC, mCRC, NSCLC, mRCC, gliobastoma	4.7 5.92 6.8
Rituximab с CD20 В-лимфоциты	Rituxan 1997	Roche	CLL, NHL, RA	5.6 5.8 6.7

CD - Crohn's Disease, UC - Ulcerative Colitis, AS - Ankylosing Spondylitis, Ps - Psoriasis, PsA - Psoriatic arthritis, RCC - renal cell carcinoma, NSCLC - Non small cell lung cancer, BC - breast cancer, CRC - Colorectal cancer, NHL - Non Hodgkin's Lymphoma, CLL - Chronic Lymphocytic Leukemia, RA - Rheumatoid Arthritis, m - metastases

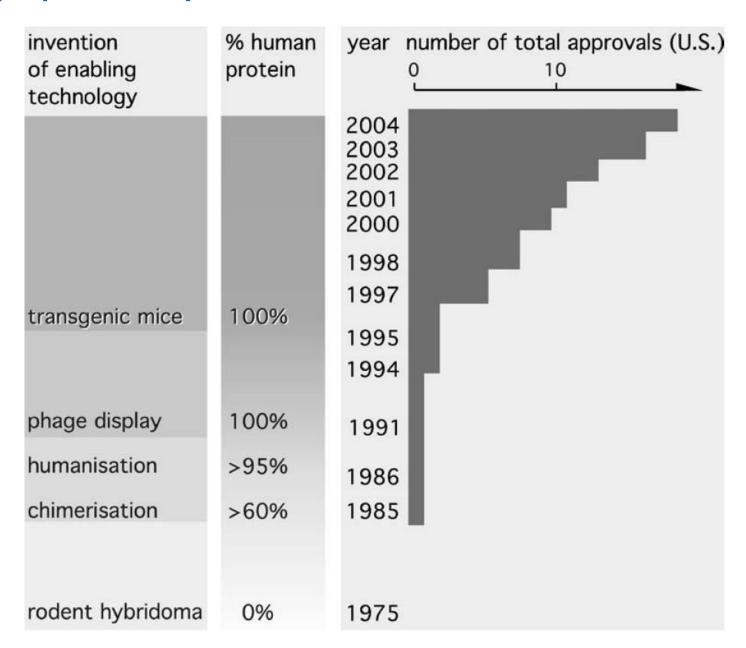
Проблема иммуногенности моноклональных антител

1980-е годы:

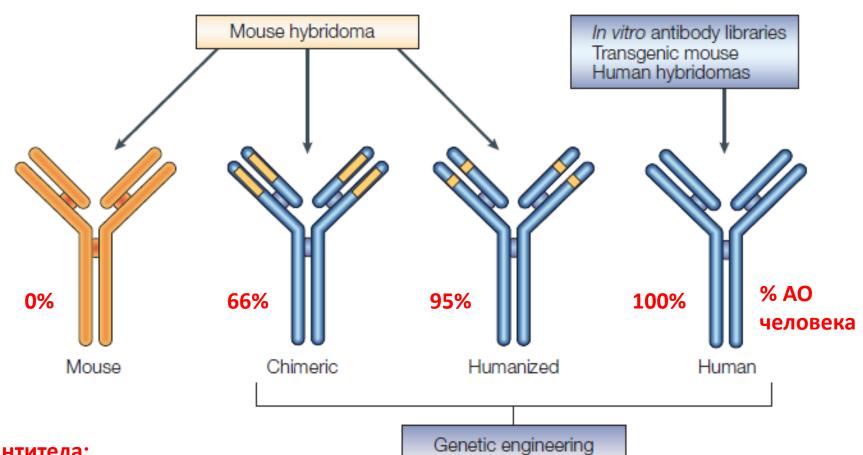
У 50% пациентов с мышиными моноклональными антителами, происходило образование антимышиных антител: Human anti-murine antibody (HAMA) response

У мышиных антител: низкие безопасность, эффективность, и время полужизни, а также неспособность выполнять эффекторные функции

Прогресс в получении моноклональных антител человека



Понижение иммуногенности мышиных моноклональных антител замещением последовательностями иммуноглобулина человека



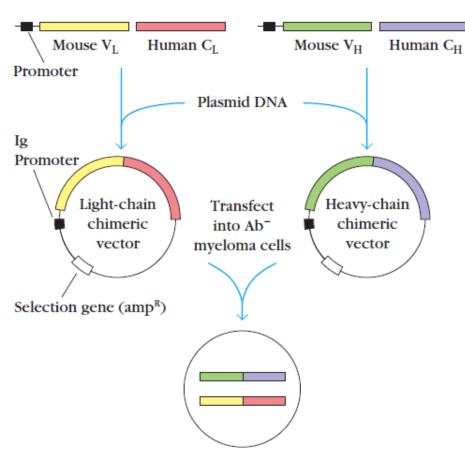
Антитела:

Мышиные, Химерные, «Очеловеченные», Человеческие

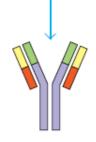
V gene cloning CDR grafting Eukaryotic expression

LIGHT-CHAIN GENES

HEAVY-CHAIN GENES

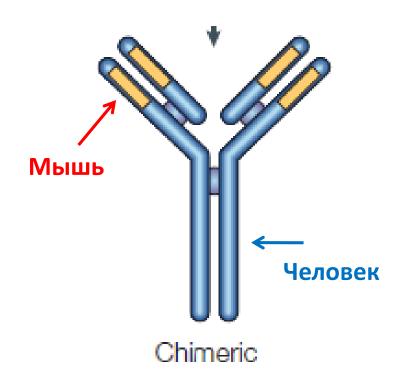


Transfected antibody-secreting myeloma cell

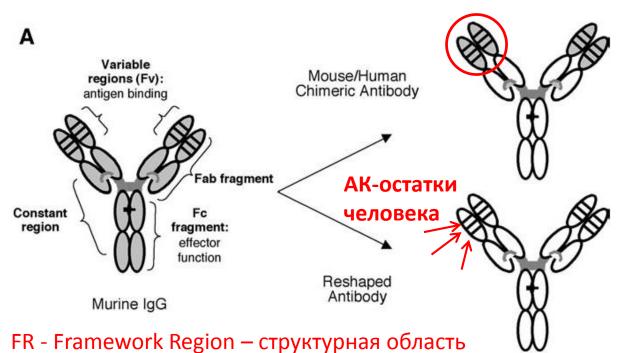


Chimeric mouse-human antibody

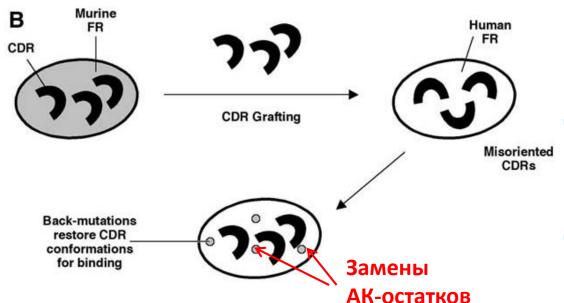
Получение химерных моноклональных антител человек-мышь



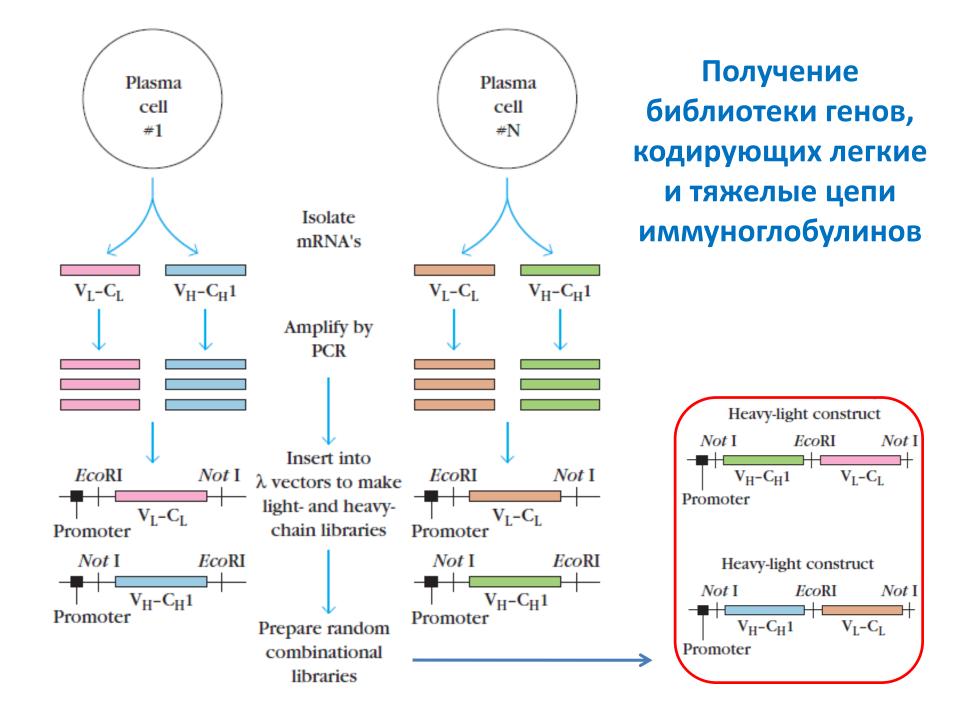
Клетки миеломы, не продуцирующие антител, трансфецировали двумя векторами, экспрессирующими химерные гены

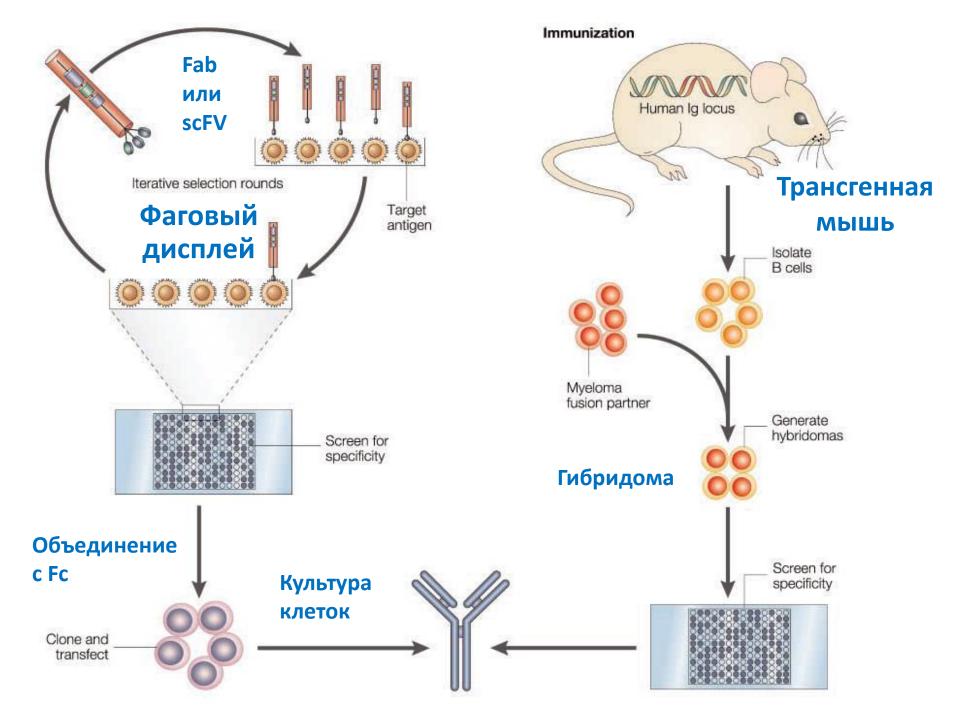


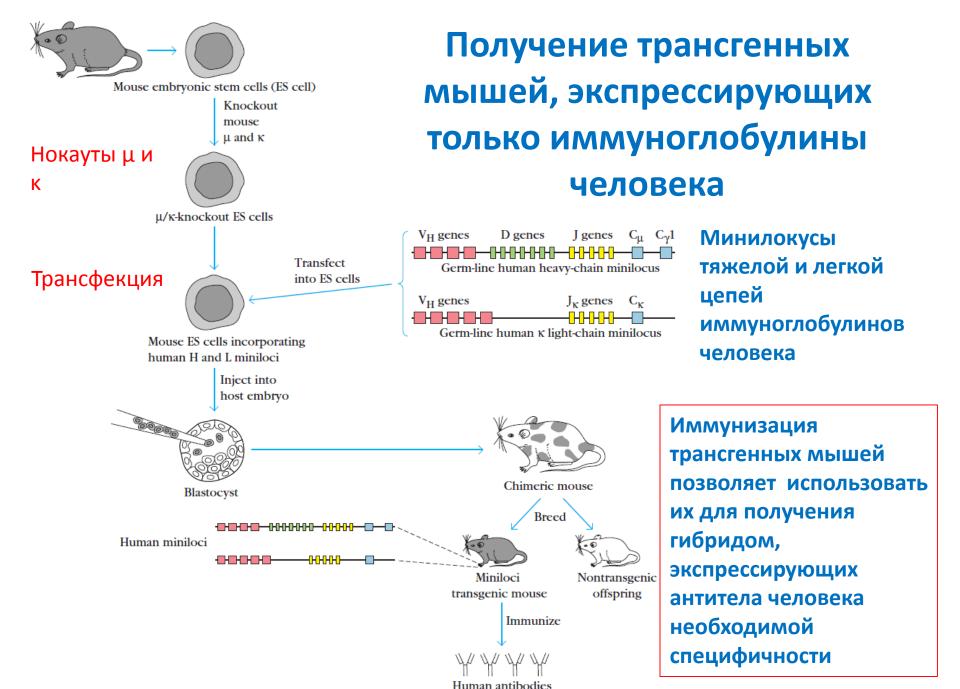
Химерные и «очеловеченные» антитела



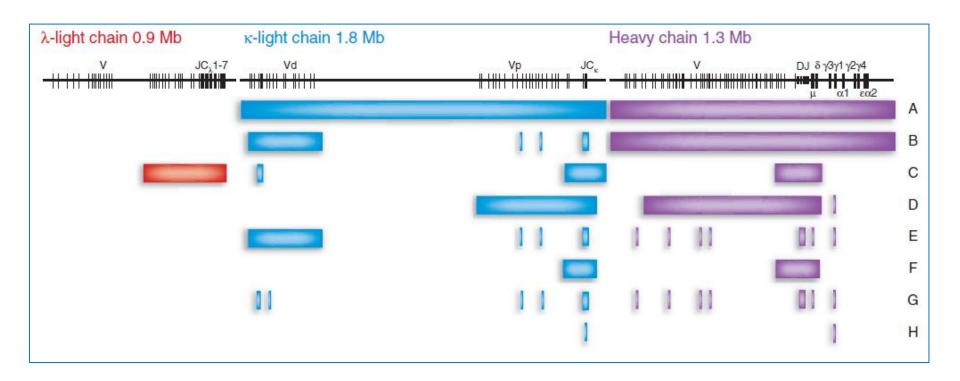
Перенос CDR-участков мышиных антител в контекст полипептида человека делает их неактивными. Возвращение активной конформации достигается путем введения дополнительных мутаций в скелет иммуноглобулина человека





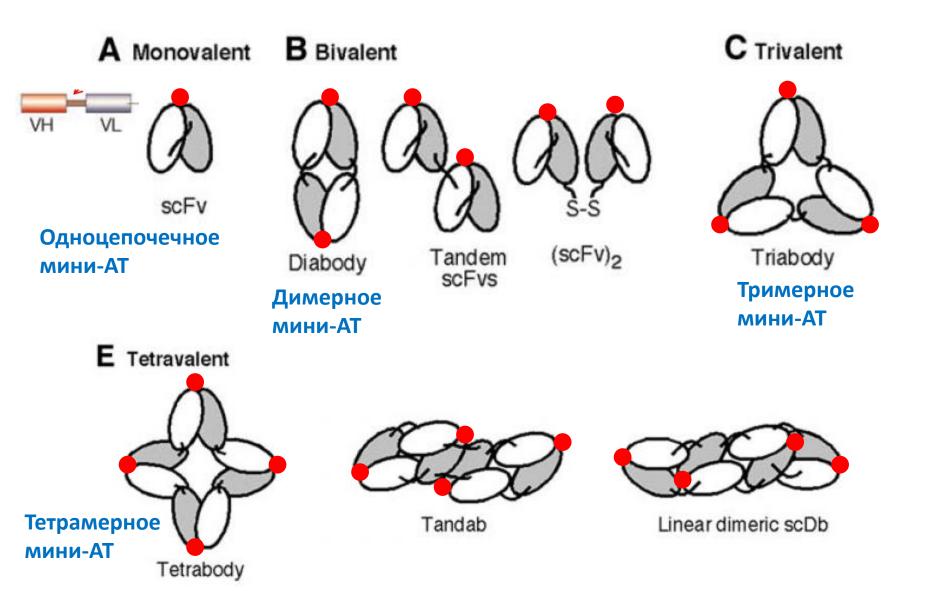


Участки генома человека, введенные трансгенным мышам в восьми разных опытах

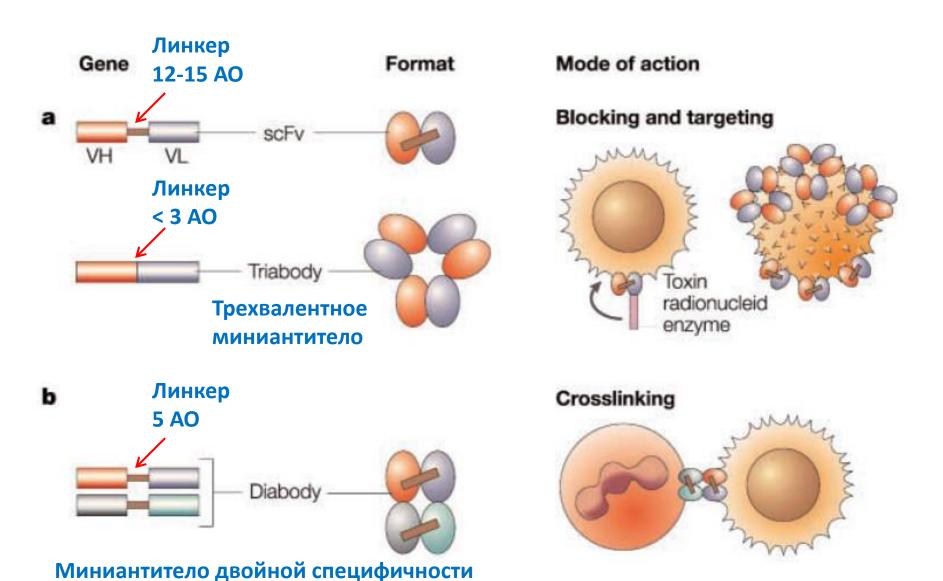


Микроклетки, полученные из фибробластов человека, сливали с эмбриональными стволовыми клетками мышей и образовавшиеся гибриды использовали для получения трансгенных мышей. Микроклетки получают в присутствии колхицина и колцемида

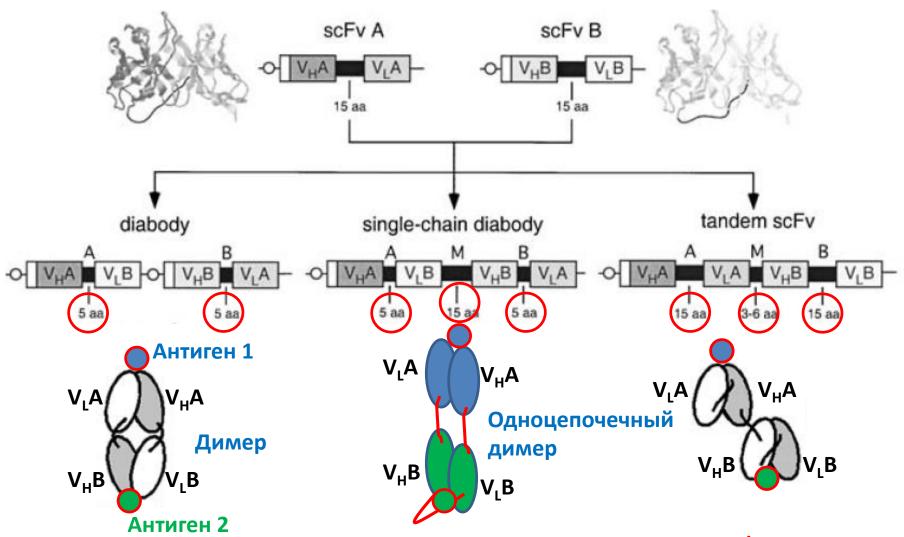
Многовалентные рекомбинантные миниантитела



Влияние длины линкера на сборку миниантител



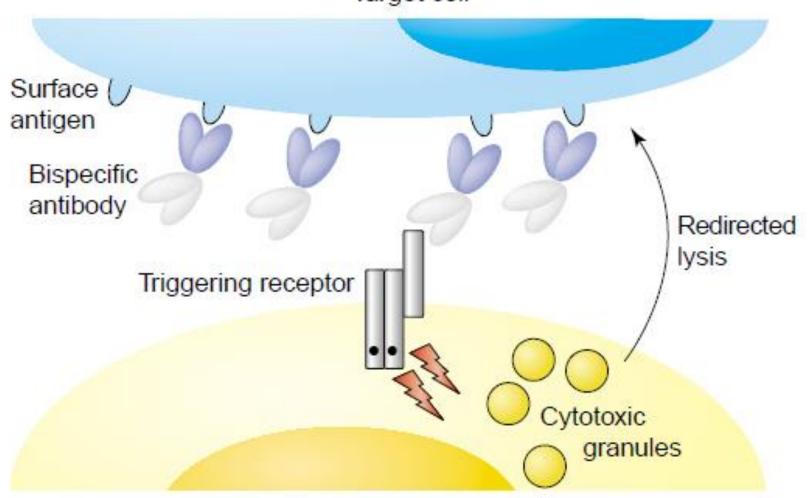
Получение рекомбинантных миниантител двойной специфичности



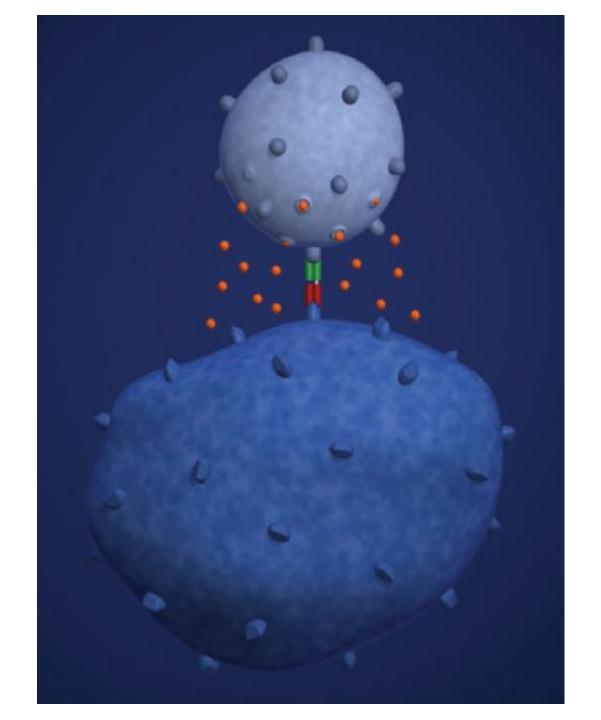
Длина пептидного линкера определяет форму антитела

Механизм действия антител двойной специфичности

Target cell



Cytotoxic effector cell



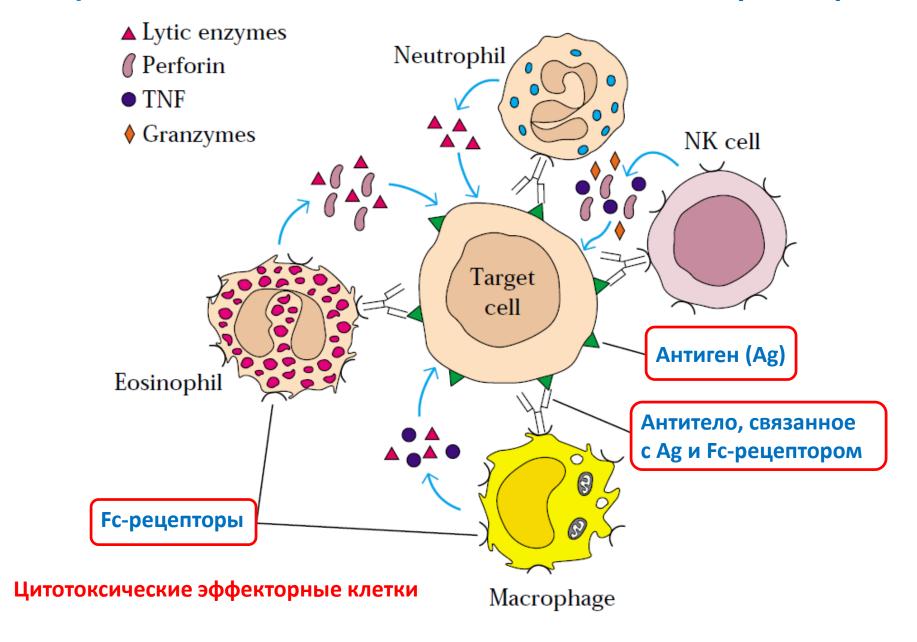
Антитела двойной специфичности

Цитотоксический Т-лимфоцит активируется антителами, притягивается к раковой клеткемишени и поражает ее

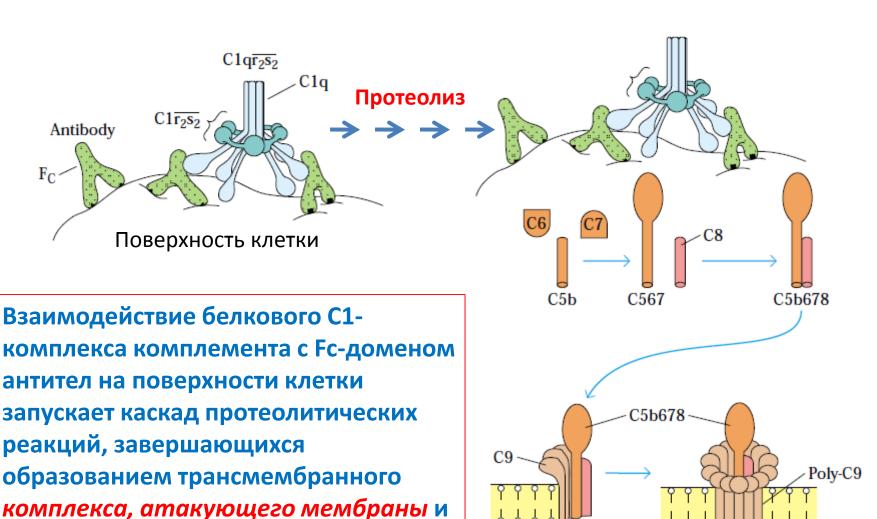
Эффекторные функции природных антител

Complement binding Fc receptor binding Цитотоксичность, Phagocytosis зависимая от комплемента CDC Target cell С1-компонент комплемента взаимодействует с иммунными комплексами, Цитотоксичность, индуцируя лизис клеток зависимая от антител или воспаление

Цитотоксичность, зависимая от антител (ADCC)

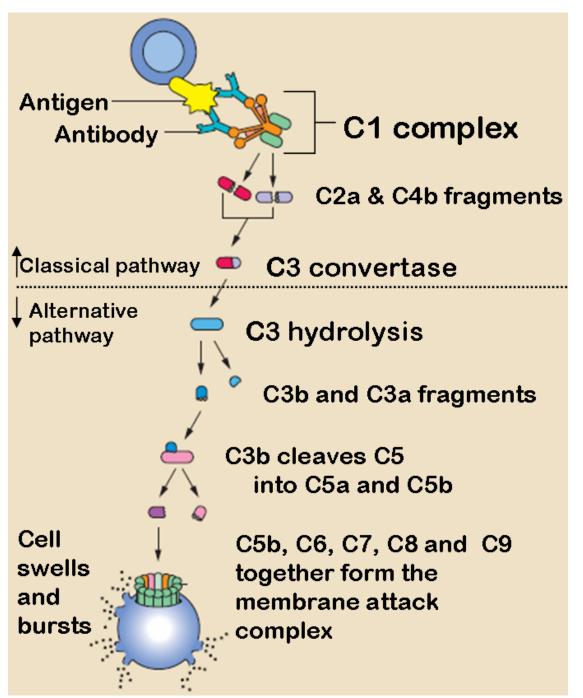


Цитотоксичность, зависимая от комплемента (CDC)



ЛИЗИСОМ КЛЕТКИ-МИШЕНИ

Membrane attack complex



Активация системы комплемента антителами, взаимодействующими с клеткой-мишенью

После взаимодействия с антителами C1-комплекс комплемента запускает каскад протеолитических реакций, приводящих к лизису клетки-мишени

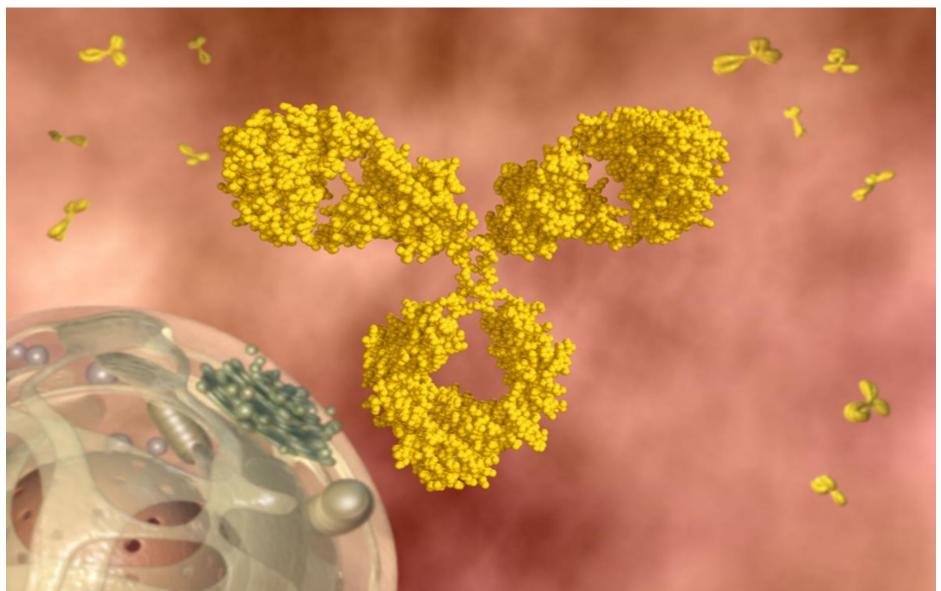
Терапевтическое использование рекомбинантных антител

- **❖** Подавление реакции отторжения трансплантата
- **⋄**Острые воспалительные и аутоиммунные заболевания
- **♦•**Инфекционные заболевания
- **♦•**Острая токсичность
- **♦•** Онкологические заболевания
- **♦ Концепция «магической пули»**

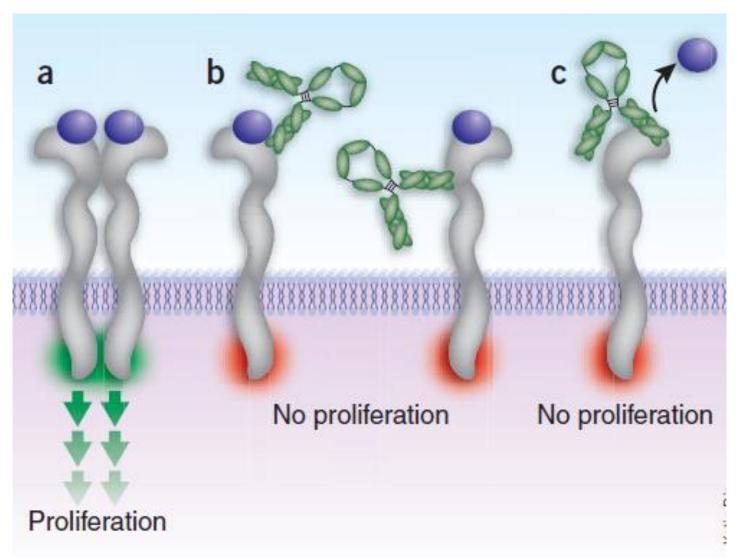


антител

Использование антител для лечения онкологических заболеваний



Взаимодействие моноклональных антител с рецепторами

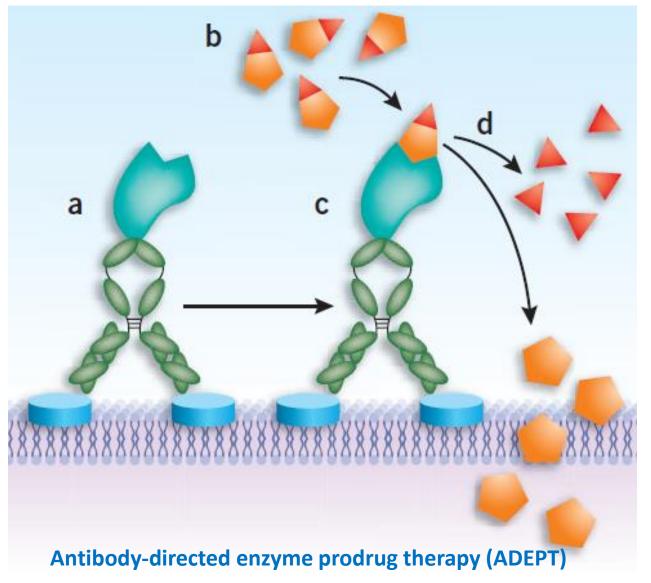


а – димеризация рецептора сопровождается активацией передачи сигналов

Б – Блок
 димеризации
 рецепторов,
 подавление
 передачи
 сигналов и
 пролиферации
 клеток

с – Препятствие связыванию лиганда

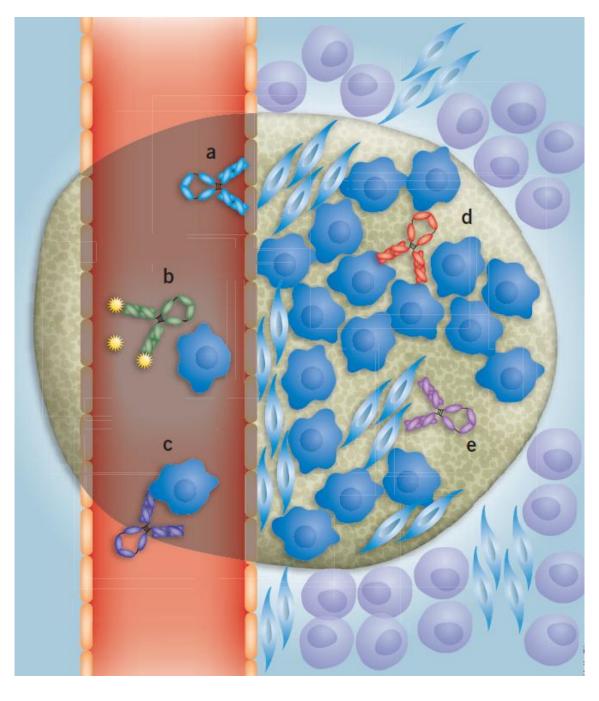
Иммуноконъюгат моноклонального антитела с ферментом, активирующим предшественник лекарственного препарата



а – Иммуноконъюгат связывают с антигеном опухолевых клеток, и избыток конъюгата удаляют из кровотока

b, c — В организм вводят предшественник лекарственного препарата, активируемого ферментом

d – Цитотоксическое действие препарата



Потенциальные мишени для антител при лечении рака

- а Клетки кровеносных сосудов, ассоциированных с опухолью
- b факторы роста сосудов, например VEGF - vascular endothelial growth factor
- с Диффузные малигнизированные клетки (лейкоз)
- d Клетки солидной опухоли
- е Клетки стромы,ассоциированной сопухолями (фибробласты)

Примеры антител, используемых для лечения онкологических заболеваний

bevacizumab (Avastin) - моноклональное антитело к фактору роста сосудистого эндотелия (VEGF).

В сочетании со стандартной химиотерапией значительно повышает выживаемость пациентов с метастатическим раком кишечника, молочной железы и легких

cetuximab (Erbitux) - моноклональное антитело к эпидермальному фактору роста (EGF)

Улучшает состояние пациентов с устойчивым химиотерапии раком кишечника

trastuzumab (Herceptin) - моноклональное антитело к HER2/neuонкогену

В сочетании с адъювантной химиотерапией повышает продолжительность жизни пациентов высокого риска с раком молочной железы

Иммуноцитокины

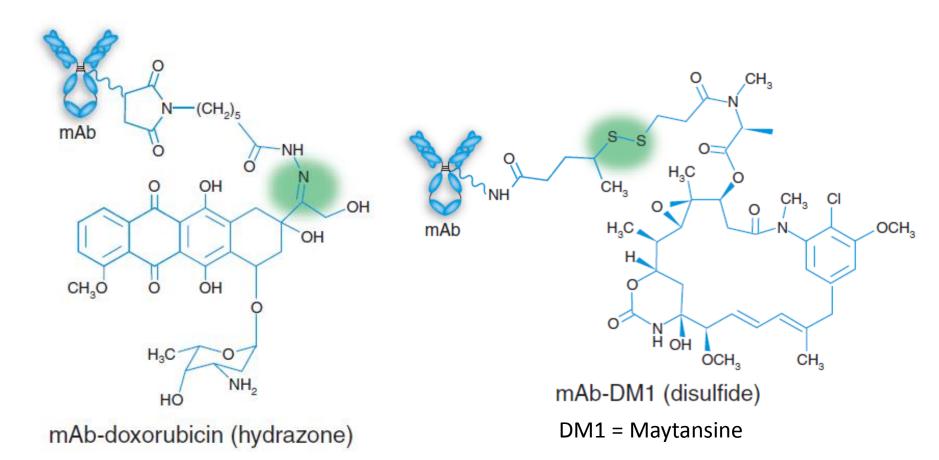
Генно-инженерное слияние антител или их фрагментов с молекулами цитокинов.

Цель – повышение стабильности и эффективной локальной концентрации цитокина вблизи антигена-мишени. Исключение токсичности, связанной с системным применением цитокинов.

Цитокины, используемые для слияния: фактор некроза опухолей (TNFα), IL2, IL12, фактор, стимулирующий колонии гранулоцитов/макрофагов (GM-CSF).

Одна из первых успешных конструкций: антитела к ганглиозиду GD2 + IL2. GD2 экспрессируется многими опухолями нейроэктодермального происхождения: нейробластома, меланома, саркомы.

Конъюгаты моноклональных антител с лекарствами



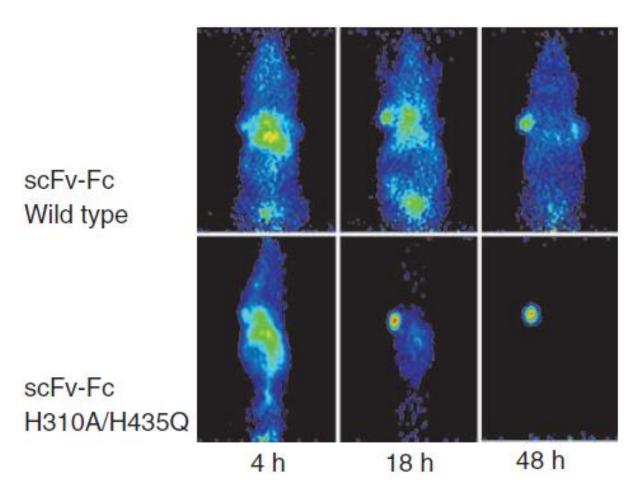
Гидролиз связи при кислых значениях рН в лизосомах клеток-мишеней — ингибирование топоизомеразы II

Внутриклеточное восстановление (разрыв) дисульфидной связи – деполимеризация тубулина

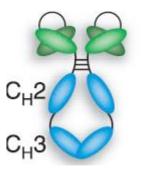
Конъюгаты моноклональных антител с лекарствами

Пептидная связь расщепляется протеазами лизосом клеток-мишеней. Ауристатин разрушает цитоскелет, вызывая деполимеризацию тубулина

Клиренс иммуноконъюгатов на основе рекомбинантных mAb из крови мышей с ксенотрансплантатом опухоли



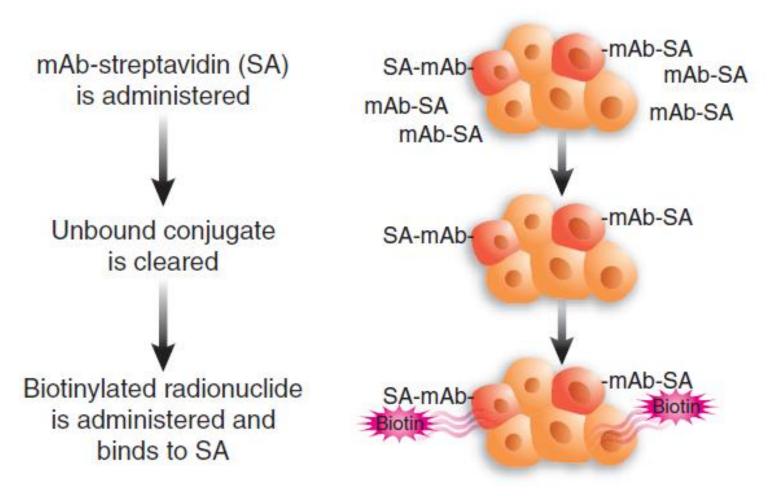
scFv-Fc



Фрагмент mAb против ракового эмбрионального антигена, меченый ¹²⁴I, вводили мышам с ксенотрансплантатом опухоли и следили за клиренсом с помощью позитронной томографии (PET)

Вверху mAb дикого типа, внизу – двойной мутант

Использование иммуноконъюгатов на основе стрептавидина



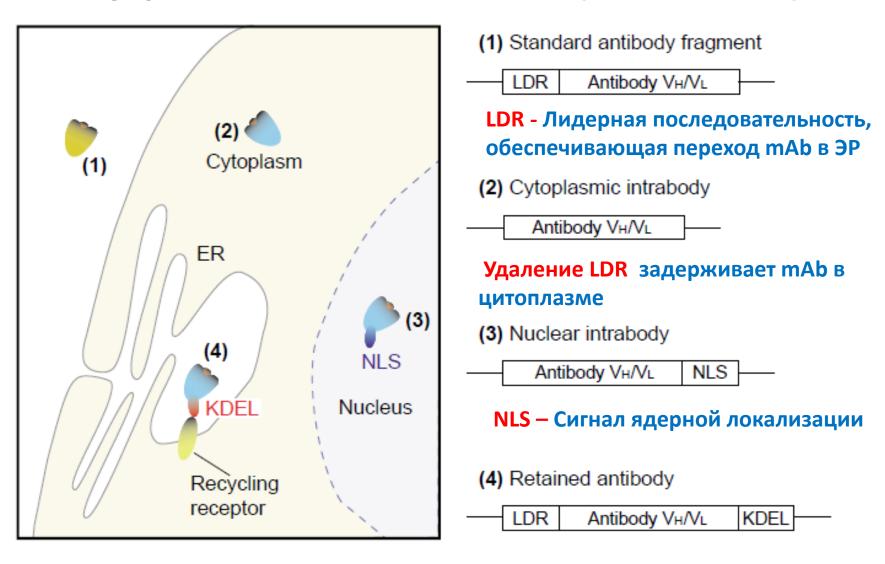
Биотинилированный радионуклид присоединяется к антителу, конъюгированному со стрептавидином

Большинство потенциальных мишеней для антител находятся внутри клеток.

Обычные антитела и их фрагменты обладают ограниченной способностью проникать в клетки.

Выход – синтез антител внутри клеток

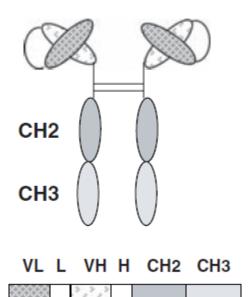
Внутриклеточные антитела (intrabodies)



KDEL – Четырехзвенный пептид, взаимодействующий с рециклизующим рецептором в мембранах эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи

Форматы рекомбинантных внутриклеточных антител

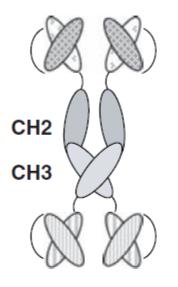
scFv-Fc ~110kDa



L: Linker, (GGGGS)₃

H: Hinge region of IgG1

Intradiabody ~150kDa



Антитела двойной специфичности

aVL L aVH CH2 CH3 bVL L bVH

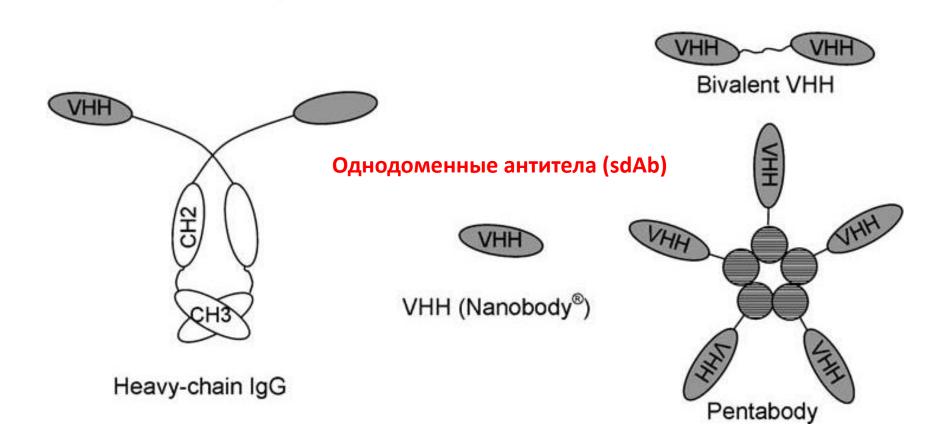
L: Linker, SSGGGGSGGGGGSSRSS

a: antibody a; b: antibody b

Доменные антитела (domain antibodies - dAb)

- ❖Получены в конце 1980-х годов в группе Г. Вингера
- ❖Полипептиды с молек. массой 15 кДа. Выделены из библиотеки V_н-фрагментов мышиных антител.
- ❖Наименьшие фрагменты антител, сохраняющие свою специфичность в отношении связывания антигена
- ❖Эффективны в отборе, последующем аффинном созревании, наработке в большом количестве и доставке к мишеням.
- ❖Удобно димеризовать для повышения авидности и получения миниантител двойной специфичности

Наноантитела (Nanobodies) на основе верблюжьих антител



Пятивалентное наноантитело (pentabody) собирают на основе В-токсина E.coli, который спонтанно пентамеризуется. В комплексе с долгоживущими белками проникают через гематоэнцефалический барьер

Иммунный ответ на идиотип антител

- ❖Идиотип молекулы антитела молекулярная структура антиген-связывающего сайта
- ❖Идиотип уникален для каждого антитела и потенциально иммуногенен
- ❖В настоящее время неясно потенциальное ограничение, накладываемое идиотипом на применение антител в терапии

Биосинтез рекомбинантных антител

Клетки E. coli

До 2 г/л, периплазматическое пространство, негликозилированы, сайтспецифическая модификация полиэтиленгликолем (40 кДа) повышает стабильность до 80% от природного IgG. Возможен синтез антител полной длины

Клетки грибов Aspergillus niger, Pichia pastoris

0,9-1,2 г/л, в секретируемой форме, частично гликозилированы, повышенная стабильность, индуцируют зависимую от антител цитотоксичность, рекомбинантные гликозилтрансферазы для гликозилирования

Трансгенные растения

Низкая себестоимость, отсутствие патогенов, характерных для систем животных, неадекватное гликозилирование, начальная стадия разработки противоопухолевых антител, растения табака, кукурузы, гороха и т.д.

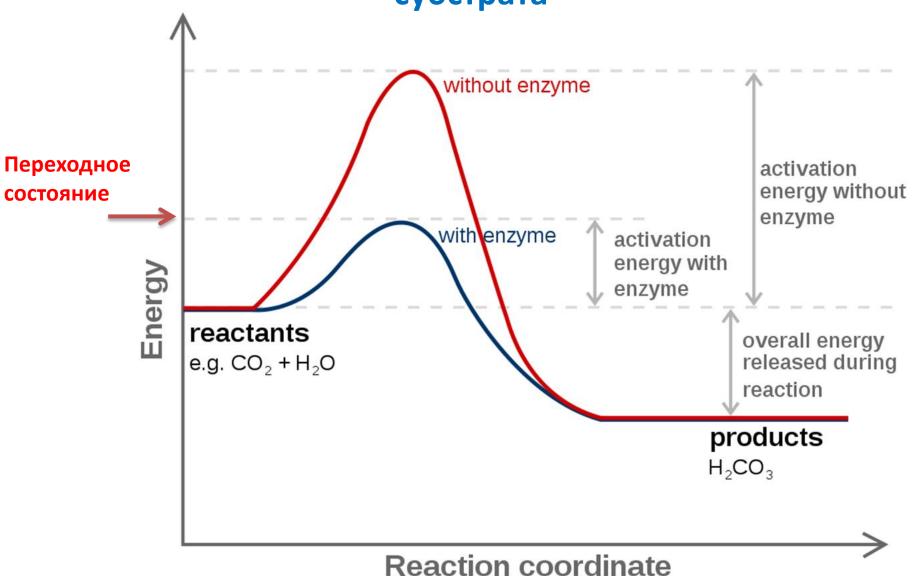
Клетки животных

Основная система производства полноразмерных антител, суспензионные безсывороточные культуры клеток СНО, борьба с апоптозом

Природные каталитические антитела (CAb, абзимы), ассоциированные с болезнями

Disease	Activity
Asthma Systemic lupus erythematosus Murine autoimmune disease Hashimoto's thyroiditis Multiple myeloma B-cell lymphomas Rheumatoid arthritis Multiple sclerosis Hemophilia A Hepatitis virus infection	Protease (VIP) Protease (thyroglobulin, VIP); DNase; RNase Esterase (induced by transition-state analogs) Protease (thyroglobulin); DNase Protease (model substrates, Arg-vasopressin, DNase Protease (related to HLA-DR sequences [24]) Protease; amylase; DNase; RNase Protease (Factor VIII) RNase

Ферментативное снижение энергии активации субстрата



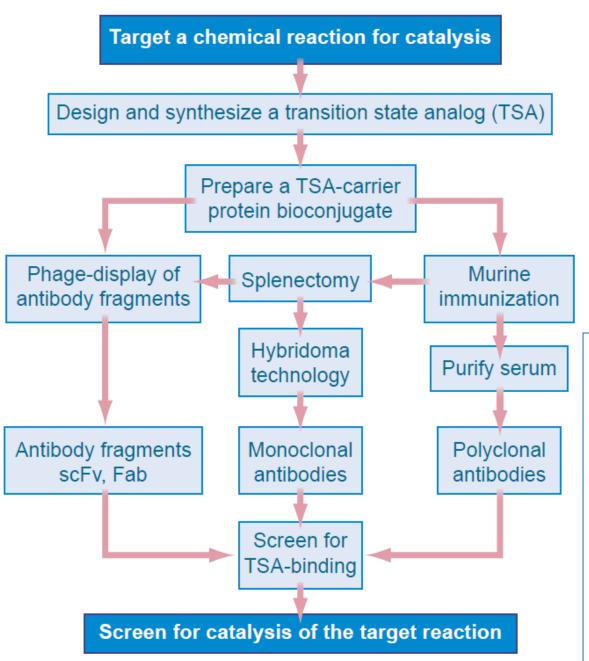


Схема получения каталитических антител, (абзимов)

TSA – transition state
analog – аналог субстрата
в переходном состоянии
scFv – single chain–
variable domain fragment
– одноцепочечный
фрагмент вариабельного
домена
Fab – фрагмент,

связывающий антиген

«Ангел Запада» - скульптура IgG-иммуноглобулина перед Институтом Скриппса (Флорида, США, 2008)

