

УДК 57.083.3

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К БЕЛКУ PRAME ЗАМЕДЛЯЮТ РАЗВИТИЕ PRAME-ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ОПУХОЛИ

© 2021 г. О. Н. Солопова^{1,*}, Ю. П. Финашутина^{1,2}, Н. Н. Касаткина¹,
Н. А. Лыжко^{1,2}, А. А. Турба², Л. А. Кесаева^{1,2}, В. А. Мисюрин^{1,2}, А. В. Мисюрин², М. В. Ларина³,
Т. К. Алиев^{3,4}, академик РАН М. П. Кирпичников^{3,4}

Поступило 30.11.2020 г.
После доработки 28.02.2021 г.
Принято к публикации 28.02.2021 г.

Два моноклональных антитела, распознающие неперекрывающиеся участки белка PRAME, вводили иммунокомпетентным мышам для оценки их влияния на рост подкожных опухолевых узлов. В качестве трансплантатов использовали линию мышинной меланомы B16F10, экспрессирующую человеческий белок PRAME либо содержащую вектор без гена *PRAME*. В результате каждое из антител показало способность подавлять опухолевый рост PRAME-экспрессирующей опухоли, но не опухоли без PRAME.

Ключевые слова: раково-тестикулярный антиген, PRAME, моноклональные антитела

DOI: 10.31857/S2686738921030148

ВВЕДЕНИЕ

Белок PRAME может быть мишенью для терапевтических моноклональных антител, так как экспрессируется примерно у половины больных солидными опухолями и онкогематологическими заболеваниями [1]. Кроме того, белок способен вызывать T-клеточный иммунный ответ у пациентов [2]. Высокий уровень экспрессии PRAME в злокачественных новообразованиях позитивно коррелирует с уровнем метастазирования, негативно с общей и безрецидивной выживаемостью, и в целом связан с плохим прогнозом для пациента. [3], [4]. Следовательно, разработка иммунотерапевтических препаратов против этого антигена может быть весьма перспективной.

В настоящее время ведется или уже проведен ряд клинических исследований по таргетированию белка PRAME, в основном это либо вакцины на основе рекомбинантного белка или адаптивная терапия T-лимфоцитами [5].

Целью данной работы было исследовать противоопухолевый эффект введения двух вариантов моноклональных антител против PRAME на модели PRAME-экспрессирующей опухоли.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали мышей линии C57BL/6, самок весом 18–20 г, возраста 7–8 нед, по 5 голов в каждой группе. Все эксперименты на животных проводили в соответствии с требованиями Комиссии по контролю за содержанием и использованием животных ФИБХ РАН (Протокол заседания № 117 от 18.02.2020 г.). Животным подкожно вводили клетки мышинной меланомы линии B16F10, трансфицированные плазмидой с геном *PRAME* и экспрессирующие соответствующий белок, либо плазмидой без гена *PRAME*, в дозе 5×10^4 клеток на мыш (день 0). При этом за 3 дня до введения опухолевых клеток, а также на 4, 7, 14, 21-й день после введения клеток меланомы, животным внутрибрюшинно вводили в физиологическом растворе по 300 мкг мышинных моноклональных антител против PRAME, клоны 6H8 и 5D3 [6], либо раствор без антител (рис. 1).

В качестве контрольного вектора использовали плазмиду pCER4 (#V04450, Invitrogen). Плазмиду pCER4-PRAME получали, клонируя кодирующую последовательность человеческого гена PRAME (NM_001291715.2) по сайту рестрикции NotI в плазмиду pCER4 для высокого уровня экспрессии гена под CMV промотором. Обе плазми-

¹ ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

² ООО «ГеноТехнология», Москва, Россия

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

*e-mail: solopova@msn.com

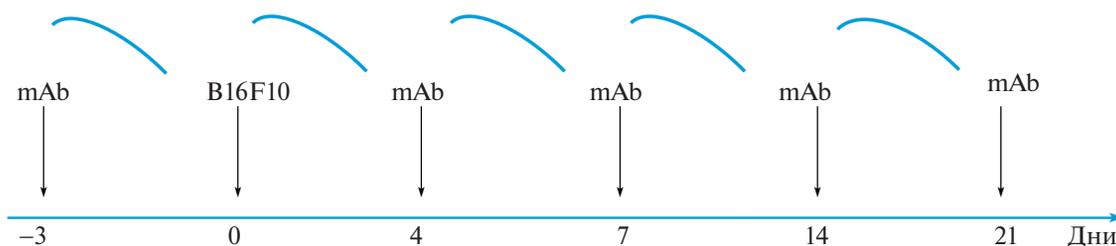


Рис. 1. Схема введения антител (дни от введения опухолевых клеток). mAb – введение антител; B16F10 – введение трансфицированных клеток мышины меланомы.

ды содержали ген устойчивости к гигромицину для селекции трансфицированных клеток.

Противоопухолевый эффект оценивали по измерениям размеров опухоли во всех группах. Размеры опухолей измерялись на 14, 18 и 21-й день после введения клеток. Пальпируемые узлы измеряли и рассчитывали объем по формуле [7]. В сыворотках крови определяли титр анти-PRAME антител методом непрямого ИФА в день введения клеток опухоли и на 21-й день. Для статистического анализа использовали критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн эксперимента был разработан таким образом, чтобы транзистентная экспрессия *PRAME* оставалась в достаточно большом проценте опухолевых клеток на весь период проведения опыта. По этой причине имплантацию опухоли проводили на фоне достаточно высокого содержания антител против *PRAME* в крови, которое контролировали при помощи ИФА. Средние значения титров антител в опытных группах показаны на

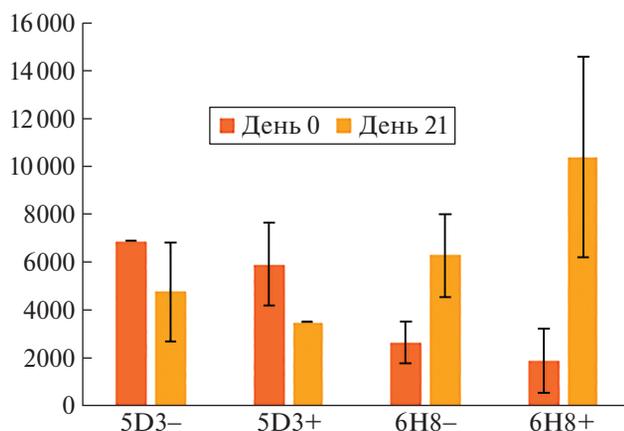


Рис. 2. Средние значения титров антител в группах мышей, получавших терапию антителами. 5D3- и 6H8- группы мышей, привитых опухолью без экспрессии *PRAME*; 5D3+ и 6H8+ группы мышей, привитых опухолью с экспрессией *PRAME*.

рис. 2. Различия в фармакокинетике двух антител могут быть обусловлены их субизотипами, IgG2a для антитела 5D3 и IgG1 для антитела 6H8. Известно, что мышинный субизотип IgG2a характеризуется слабым связыванием с неонатальным Fc рецептором, ответственным за рециркуляцию антител в организме [8].

Экспрессия человеческого белка *PRAME* в трансфицированных клетках B16F10 перед прививанием мышам была подтверждена методами иммуноблота и проточной цитометрии (данные не приведены).

Измерение размеров опухолей показало, что на 21-й день объемы опухоли, экспрессирующей человеческий белок *PRAME*, у мышей статистически значимо снижены при введении обоих вариантов мышинных антител к *PRAME* (5D3 и 6H8), $p = 0.0199$ по сравнению с контрольной группой без антител (рис. 3), тогда как в группах с меланомой без экспрессии человеческого *PRAME* введение антител не привело к подавлению роста опухоли (рис. 4).

Следует отметить, что скорость пролиферации линии B16F10, экспрессирующей *PRAME*, существенно выше скорости пролиферации той же линии, трансфицированной “пустым” вектором, не содержащим гена *PRAME*. Это различие наблюдается как в культивировании *in vitro* (данные не приведены), так и при трансплантации животным, что хорошо видно на рис. 3 и 4.

Тем не менее оба антитела оказались способными сдерживать более агрессивную *PRAME*-содержащую меланому B16F10. Ранее было показано [9], что антитела 6H8 и 5D3 направлены к разным неперекрывающимся участкам белка *PRAME*, но тем не менее каждое по отдельности способно подавлять рост опухолевых узлов. Это наблюдение придает большую привлекательность использования *PRAME* в качестве мишени при терапии онкологических заболеваний, поскольку уход опухоли от действия препаратов при помощи мутаций в данном случае будет затруднен.

При сравнении противоопухолевой активности двух антител необходимо учитывать разный

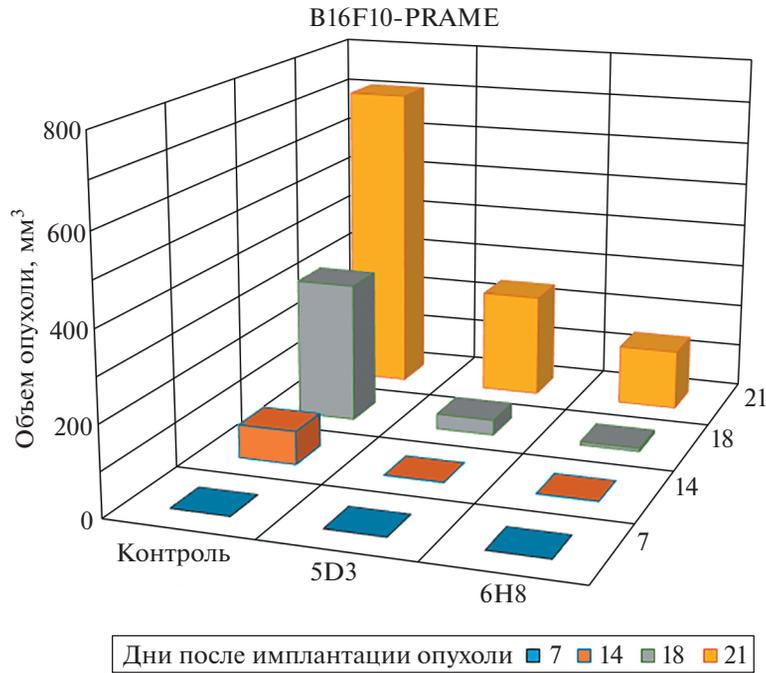


Рис. 3. Размер опухолевых узлов меланомы B16F10-PRAME. Контроль – без антител; 5D3, 6H8 – моноклональные антитела против PRAME.

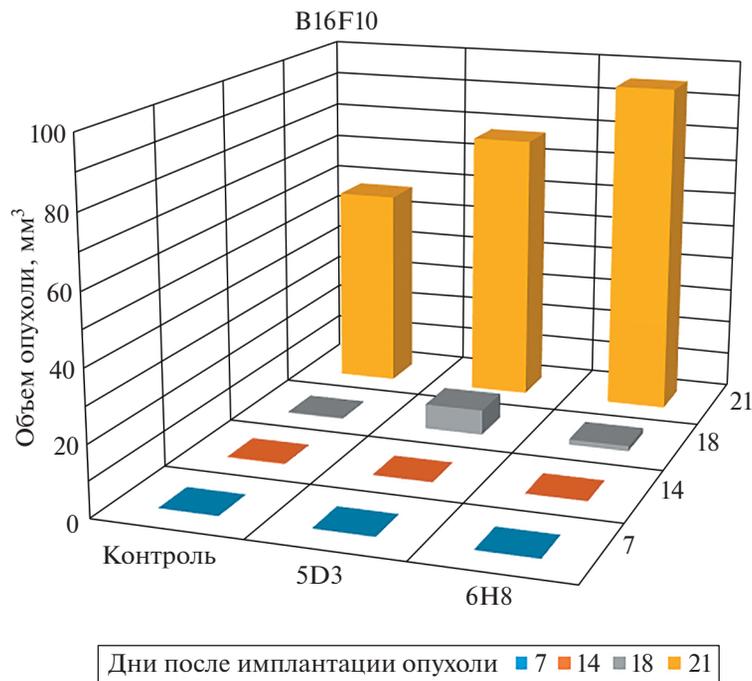


Рис. 4. Размер опухолевых узлов меланомы B16F10 без экспрессии PRAME. Контроль – без антител; 5D3, 6H8 – моноклональные антитела против PRAME.

характер их взаимодействия с FcRn в силу различий субизотипов. На мышинной модели мы видим, что антитело 6H8 более выражено подавляет опухолевый рост по сравнению с антителом

5D3, однако это происходит на фоне большего содержания антитела 6H8 в кровотоке животных во время эксперимента. При использовании гуманизированных аналогов этих антител с одина-

ковыми субизотипами эти различия могут быть нивелированы. Таким образом, оба антитела являются перспективными с точки зрения разработки терапевтического препарата для лечения злокачественных опухолей, экспрессирующих белок PRAME.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1249 от 10.06.2019). Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60418X0204.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yichi Xu, Ruanmin Zou, Jing Wang et al.* The role of the cancer testis antigen PRAME in tumorigenesis and immunotherapy in human cancer. *Cell Prolif.* 2020 Mar; V. 53. № 3. e12770.
2. *Мисюрин В.А.* // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2018. № 11 (1). С. 26–33.
3. *Li J., Yin J., Zhong J. et al.* Clinicopathological and Prognostic Significance of PRAME Overexpression in Human Cancer: A Meta-Analysis. // *Biomed Res Int.* 2020 Dec 10. P. 2020:8828579.
4. *Albertsmeier M., Altendorf-Hofmann A., Lindner L.H. et al.* Cancer Testis Antigens and Immunotherapy: Expression of PRAME Is Associated with Prognosis in Soft Tissue Sarcoma // *Cancers (Basel).* 2020 Dec 3. V. 12. № 12. P. 3612.
5. *Al-Khadairi G. and Decock J.* Cancer Testis Antigens and Immunotherapy: Where Do We Stand in the Targeting of PRAME? // *Cancers (Basel).* 2019 Jul. V. 11. № 7. P. 984.
6. *Финашутина Ю.П., Мисюрин А.В., Ахлынина Т.В. и др.* Получение рекомбинантного раково-тестикулярного белка PRAME и моноклональных антител к нему. // *Российский биотерапевтический журнал.* 2015. Т. 14. № 3. С. 29–36.
7. *Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др.* Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I.* Под ред. А.Н. Миронова, Н.Д. Бунятына, А.Н. Васильева и др. М.: Гриф и Ко, 2012. С. 640–54.
8. *Andersen J.T., Daba M.B., Berntzen G., et al.* Cross-species binding analyses of mouse and human neonatal Fc receptor show dramatic differences in immunoglobulin G and albumin binding. // *J Biol Chem.* 2010. V. 285. P. 4826–4836.
9. *Мисюрин В.А., Финашутина Ю.П., Турба А.А. и др.* Эпитопный анализ мышинных и химерных моноклональных антител, распознающих раково-тестикулярный антиген PRAME. // *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни.* 2020. Т. 492. № 1. С. 293–296.

MONOCLONAL ANTIBODIES TO PRAME PROTEIN SLOW THE DEVELOPMENT OF PRAME-EXPRESSING TUMOUR

O. N. Solopova^{a, #}, Yu. P. Finashutina^{a, b}, N. N. Kasatkina^a, N. A. Lyzhko^{a, b}, A. A. Turba^a, L. A. Kesaeva^{a, b}, V. A. Misyurin^{a, b}, A. V. Misyurin^b, M. V. Larina^c, T. K. Aliev^{c, d}, and Academician of the RAS M. P. Kirpichnikov^{c, d}

^a *N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation*

^b *LLC “GeneTechnology”, Moscow, Russian Federation*

^c *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation*

^d *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: solopova@msn.com*

Two monoclonal antibodies recognizing non-overlapping epitopes of the PRAME protein were injected into immunocompetent mice to study their influence on the growth of subcutaneous tumour nodes. The B16F10 murine melanoma line, either expressing human PRAME protein or bearing only a vector without PRAME gene, have been used as transplants. Each of the antibodies demonstrated the ability to suppress tumour growth of a PRAME-expressing tumour, but not a tumour without PRAME.

Keywords: cancer testis antigen, PRAME, monoclonal antibodies abstract