

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090344 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.08

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.06.29

(54) МОНО- И БИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С hERG1 И hERG1/ИНТЕГРИНОМ БЕТА 1

(31) 102017000083637

(32) 2017.07.21

(33) IT

(86) PCT/EP2018/067641

(87) WO 2019/015936 2019.01.24

(71) Заявитель:
УНИВЕРСИТА ДЕЛЬИ СТУДИ ДИ
ФИРЕНЦЕ; ДИ.В.А.Л. ТОСКАНА
С.Р.Л. (IT)

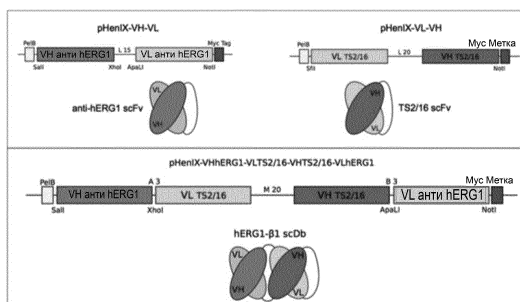
(72) Изобретатель:

Арканджели Аннароза, Дуранти
Клаудиа, Каррарези Лаура, Крешоли
Сильвия (IT)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение описывает биспецифическое антитело, состоящее из вариабельных доменов (VH и VL) двух антител, mAb против hERG1 (который связывает внеклеточный домен S5-P hERG1) и mAb против β 1-интегрин TS2/16 или BV7, которые связывают внеклеточный домен β 1-интегрин. Настоящее изобретение относится также к новой анти-hERG1 молекуле, несущей Cys в положении 95 домена VH. Изобретение описывает также их применение в диагностических и терапевтических целях в онкологии и других областях медицинских наук.



A1

202090344

202090344

A1

МОНО И БИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С HERG1 И HERG1/ИНТЕГРИНОМ БЕТА 1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области антител и их применению для диагностических и терапевтических целей в онкологии и других областях медицинских наук. В частности, оно относится к молекулам против hERG1 и их сконструированным производным, включающим биспецифичные антитела, нацеленные как на hERG1, так и на β 1-интегрин.

Предшествующий уровень техники

За последние два десятилетия технология получения антител была значительно улучшена благодаря конструированию антител; Появление новых технологий в области молекулярной инженерии привело к получению широкого спектра генно-инженерных антител, таких как фрагменты типа Fab, Fv-формы простой цепи scFv, диател, триател, биспецифических молекул, минител, нанотел, фаговых антител. На самом деле существует ряд применений, в которых Fc-опосредованные эффекты не требуются и даже нежелательны из-за связанных с ними токсических эффектов и их способности вызывать иммунный ответ, способный нейтрализовать эффективность антитела, когда его Fc получен из нечеловеческого источника.

Среди сконструированных фрагментов антител одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) является наиболее популярным и одним из наименьших рекомбинантных форматов с функцией антигенсвязывающей активности и обладает свойством легкого управления для иммунологического применения.

ScFv состоит из переменных областей тяжелых (VH) и легких (VL) цепей, которые соединены друг с другом гибким пептидным линкером, не нарушая точность сайтов спаривания VH-VL и антигенсвязывающих сайтов. Выбор линкера может повлиять на растворимость, экспрессию и правильное сворачивание scFv. Пептидные линкеры могут иметь длину от 10 до 25 аминокислот и обычно состоят из гидрофильных аминокислот, таких как глицин (G) и серин (S). Гидрофильные последовательности предотвращают интеркаляцию пептида внутри или между переменными доменами на всем протяжении укладки белка. Наиболее распространенным используемым линкером является мотив (Gly4Ser)₃, благодаря его гибкости, нейтральному заряду и растворимости. Применение scFv в диагностике и терапии дает ряд преимуществ по сравнению с цельными антителами, особенно в терапии солидных опухолей; на самом

деле, скорость проникновения фрагмента по сравнению с интактной молекулой является наиболее заметным преимуществом. В 1988 году было установлено, что интактной молекуле IgG потребовалось пятьдесят четыре часа, чтобы проникнуть на 1 мм в солидную опухоль, в то время как фрагмент Fab прошел такое же расстояние за шестнадцать часов. Кроме того, scFv, как и все другие форматы фрагментов антител, может быть превращен в многовалентные и полиспецифические реагенты или легко связан с терапевтическими средствами, такими как радионуклиды, токсины или наночастицы, и разработан для улучшения их диагностической и терапевтической эффективности.

Эти сконструированные молекулы легко продуцируются в бактериальных или дрожжевых системах, кроме того, они более эффективно подвергаются экстравазации и имеют более высокую способность проникновения в ткани, чем Ig полной длины; единственное ограничение этих молекул - короткий период полувыведения из-за их небольшого размера. Было разработано много стратегий для улучшения фармакокинетики, таких как мультимеризация scFv (укорочение их линкерной последовательности) с образованием триател (около 90 кДа) и тетрател (около 120 кДа), или конъюгация антител к большим молекулам, таким как полиэтиленгликоль (ПЭГ) (Natarajan et al. 2005) или сывороточный альбумин человека (HSA).

Биспецифичные антитела (bsAb) в последнее время привлекли большое внимание в качестве потенциальных противоопухолевых терапевтических агентов, поскольку они предлагают несколько преимуществ:

- bsAb могут перенаправлять специфические иммунные клетки на опухолевые клетки, тем самым усиливая уничтожение опухоли;
- bsAb могут одновременно блокировать две разные мишени в разных путях, которые выполняют уникальные или перекрывающиеся функции в патогенезе;
- bsAb может потенциально увеличить специфичность связывания, взаимодействуя с двумя различными антигенами клеточной поверхности вместо одного.

Разработка биспецифичных антител (bsAb) столкнулась с множеством трудностей, главным образом из-за производственных проблем, плохого выхода, нестабильности и иммуногенности (Spiess C. et al, 2015).

Что касается методологии производства bsAb, они в основном производятся тремя способами, которые включают:

- технологию квадром, основанную на соматическом слиянии двух разных линий гибридомных клеток;
- химическая конъюгация с использованием химических перекрестно-

сшивающих агентов;

- генетические подходы с использованием технологии рекомбинантных ДНК.

Биспецифичные антитела можно условно разделить на две основные подгруппы: молекулы, подобные иммуноглобулину G (IgG), и молекулы, не похожие на IgG, и до настоящего времени в клинической разработке находится более 30 bsAb, причем два препарата - Катумаксомаб и Блинатумомаб - уже одобрены для продажи.

Не-IgG-подобные включают в основном bsAb на основе scFv и нанотела. Известно, что scFv могут становиться димерами, тримерами или тетрамерами в зависимости от длины линкера, последовательности антитела и других факторов (Le Gall F. et al., 1999). Такой формат является предпочтительным и имеет много возможных клинических применений. Среди форматов bsAb на основе scFv существуют:

- Тандемные scFv, которые состоят из двух scFv, связанных гибким пептидным линкером, таким как глицин-сериновые повторяющиеся мотивы в тандемной ориентации. Знаменитая технология привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE) основана на этом формате (Chames P. et al., 2009).
- Формат диатела, в котором переменные домены двух разных антител связаны двумя линкерами. Они имеют функцию увеличения стабильности диатела.
- Одноцепочечные диатела (scDb), формат диатела может быть преобразован в одноцепочечный диатело путем добавления дополнительного линкерного соединения между цепями
- Тандемные диатела (TandAb) образованы двумя парами доменов VL и VH, соединенных в одну полипептидную цепь, образуя четырехвалентный TandAb.
- Переориентирующиеся молекулы с двойной аффинностью (DART) DART создаются путем ассоциации VH первой переменной области, связанной с VL на второй цепи, и VH второй переменной области, связанной с VL на первой цепи в VLA - VHB + VLB - конфигурация VHA. Из-за их небольшого размера DART склонны к уничтожению (Moore P.A. et al., 2011).

Диатела и scDb также являются наиболее эффективным способом получения фрагментов биспецифичных антител, способных связывать два разных антигена и, следовательно, полезных для сшивания клеток (например, перенацеливания эффекторных клеток иммунной системы); привлечения эффекторных молекул (таких как токсины, лекарственные средства, цитокины, радиоизотопы или системы комплемента) для перенацеливания системы-носителя (например, вирусных векторов для генной терапии) (Kontermann, 2005); нацеливания и ингибирования макромолекулярных комплексов, участвующих в прогрессировании опухоли.

Антительная инженерия также обеспечила способы увеличения авидности (например, мультимеризацией фрагментов антител); аффинности (например, мутацией в переменных областях целых Ig или фрагментов антител); и усилила эффекторные функции (например, мутацией в константных областях цельного Ig или конъюгаций фрагментов антител с рекомбинантным Fc, токсином, лекарственными средствами, цитокинами, лигандами смерти, радиоизотопами, наночастицами или молекулами системы комплемента).

За последние три десятилетия ген специфических калиевых каналов сердца человека 1 (hERG1) стал мишенью в онкологии и при других заболеваниях человека. Однако его применение в терапевтических целях было затруднено тем фактом, что большинство лекарственных средств, которые вызывают блокаду hERG1 в качестве основного или побочного эффекта, могут вызывать кардиотоксичность (удлинение интервала электрокардиографического QT и возникновение желудочковых аритмий). В поисках биофизических и биомолекулярных признаков, которые отличают hERG1, экспрессируемый в сердце, от hERG1, экспрессируемого в раковых клетках и других клетках, характерных для заболеваний, было обнаружено, что hERG1 образует комплексы с другими белками плазматической мембраны, в частности с субъединицей β 1 рецепторов интегрин, на плазматической мембране раковых клеток. Такой комплекс не встречается в миоцитах сердца (Becchetti A. et al., *Sci. Signaling*, 10 (473). pii: eaaf3236. doi: 10.1126/scisignal.aaf3236. PMID: 28377405, 2017). Следовательно, комплекс hERG1/ β 1 интегрин конфигурируется как онкогенная единица, свойственная трансформированным клеткам, факт, который дифференцирует hERG1 в опухоли от канала, экспрессируемого в сердце. Это открытие означает, что любая молекула (низкомолекулярное лекарственное средство или в ином случае белок), нацеленная на комплекс hERG1/ β 1 интегрин, может использоваться в диагностических и терапевтических целях, будучи лишенной кардиотоксичности. В настоящее время молекулы, способные нацеливаться на комплекс hERG1/ β 1 интегрин, не известны.

В итальянском патенте IT1367861 описан клон гибридной клеточной линии, названный A7, способный секретировать моноклональное антитело против hERG1 (mAb), специфичное в отношении внеклеточной части S5-поры hERG1.

В WO2016020483 (A1) описывается подробная структура интактной мышинной моноклональной молекулы против hERG1 и соответствующее получение анти-hERG1 scFv, полученного после выделения VH и VL анти-hERG1 mAb. Такой scFv обладает той же специфичностью, что и соответствующее целое антитело, и, таким образом, способен распознавать тот же анти-hERG1 белок, который аберрантно экспрессируется в опухолях

и других заболеваниях. Нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3, кодирующие соответственно VH (SEQ ID NO: 2) и VL (SEQ ID NO: 4), были раскрыты вместе с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 5, кодирующей scFv, имеющую SEQ ID NO: 6.

В данной области техники в исследовательских целях известны анти-бета1 интегрин mAb, например, среди прочего известны TS2/16 (Arroyo et al. J. Cell Biol. 1992, 117 (3), 659-670) и BV7 (Martin-Padura et al. J. Biol. Chem. 1994, 269(8), 6124-6132).

Целью настоящего изобретения является создание биспецифического антитела, которое одновременно направлено на белки hERG1 и бета1 интегрин, и которое образует комплекс на плазматической мембране раковых клеток. Еще одной целью настоящего изобретения является создание улучшенного или, по меньшей мере, альтернативного антитела против hERG1.

Сущность изобретения

Объектом настоящего изобретения является биспецифическое антитело (bsAb), содержащее переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) анти-hERG1 Ab, которое связывает внеклеточный домен S5-P hERG1 и переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) анти- β 1-интегрин Ab, которое связывает внеклеточный домен β 1-интегрин.

Неожиданно было обнаружено, что bsAb по изобретению способно избирательно связывать комплекс hERG1 + β 1-интегрин, который присутствует только в опухолевых клетках. В частности, bsAb по изобретению продемонстрировал способность *in vitro* ингибировать рост клеток и миграционную, прометастатическую активность на панели неопластических клеточных линий.

В аспекте настоящее изобретение относится также к молекуле анти-hERG1, содержащей переменный домен тяжелой цепи (VH), имеющий, по меньшей мере, 85% идентичности с SEQ ID NO: 8, где остаток в положении 95 представляет собой Cys, и переменный домен легкой цепи (VL), имеющий, по меньшей мере, 85% идентичности с SEQ ID NO: 4, причем указанная молекула обладает специфичностью в отношении внеклеточной части s5-поры hERG1.

Неожиданно было обнаружено, что молекула анти-hERG1 (анти-hERG1-Cys) по изобретению, имеющая Cys в положении 95 домена VH (SEQ ID No: 8), показала лучшее сродство к иммобилизованному антигену по сравнению с молекулой, известной в данной области техники, имеющей Phe в положении 95 домена VH (SEQ ID No: 2). В частности, молекула scFv по изобретению показала способность *in vitro* ингибировать рост клеток на панели линий опухолевых клеток.

Подробное описание изобретения

Предпочтительно bsAb по изобретению представляют собой такие, у которых переменный домен (VH) тяжелой цепи анти-hERG1 Ab имеет 85% идентичности с SEQ ID No: 8 или SEQ ID No: 2; и переменный домен (VL) легкой цепи анти-hERG1 Ab имеет 85% идентичности с SEQ ID No: 4; и переменный домен (VH) тяжелой цепи и переменный домен (VL) легкой цепи анти- β 1-интегрин Ab имеют, по меньшей мере, 85% идентичности с VH и VL TS2/16 (SEQ ID N: 26 и 24) или BV7 (SEQ ID N: 46 и 48).

Предпочтительно bsAb по изобретению представляет собой не IgG-подобное bsAb, предпочтительно bsAb на основе scFv. Согласно изобретению bsAb на основе scFV имеет формат, выбранный в группе, состоящей из tandemных scFv, формата диатела, одноцепочечных диател, tandemных тел (TandAb) и переориентирующихся молекул с двойной аффинностью (DART), предпочтительно scDb.

Предпочтительно домен VH анти- β 1-интегрин Ab имеет 90%, 95%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 46, более предпочтительно SEQ ID NO: 26.

Предпочтительно домен VL анти- β 1-интегрин Ab имеет 90%, 95%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 48, более предпочтительно SEQ ID NO: 24.

Предпочтительно VH-домен Ab против hERG1 Ab, все еще сохраняющий аминокислоту Cys в положении 95, имеет 90%, 95%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 8.

Предпочтительно домен VH Ab против hERG1 имеет 90%, 95%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 2.

Предпочтительно домен VL Ab против hERG1 имеет 90%, 95%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 4.

Домен VH анти-hERG1-Cys Ab согласно настоящему изобретению предпочтительно кодируется последовательностью нуклеотидов, имеющих, по меньшей мере, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% гомологии с SEQ ID No: 7 где триплет из остатков с 283 по 285 может быть TGT или TGC.

Домен VH анти-hERG1 Ab согласно настоящему изобретению предпочтительно кодируется последовательностью нуклеотидов, имеющих, по меньшей мере, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% гомологии с SEQ ID No: 1.

Домен VL анти-hERG1 Ab согласно настоящему изобретению предпочтительно кодируется последовательностью нуклеотидов, имеющих, по меньшей мере, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% гомологии с SEQ ID No: 3.

Молекула согласно изобретению может представлять собой полностью гуманизированное рекомбинантное антитело.

Молекула согласно изобретению может представлять собой scFv или любое другое сконструированное антитело, такое как Fab, Fv-форма простой цепи scFv, диатела, триатела, биспецифические молекулы, минитела, фаговые антитела; предпочтительными являются scFv и диатела (scDb).

Предпочтительными линкерами являются мотивы (Gly4Ser)₃.

Особенно предпочтительным является анти-hERG1-Cys scFv, где VH и VL связаны пептидным линкером; более предпочтительным является анти-hERG1-Cys scFv, имеющий SEQ ID No: 10.

Особенно предпочтительным является bsAb, который представляет собой одноцепочечное диатело (scDb), содержащее анти-hERG1-Cys scFv и анти-β1-интегрин scFv, таким образом, селективно воздействуя на комплекс hERG1 + β1-интегрин, который присутствует только в опухолевых клетках.

Следовательно, для предпочтительного аспекта настоящее изобретение относится к одноцепочечному диателу bsAb (scDb), содержащему первый вариабельный домен (VH) тяжелой цепи, имеющий, по меньшей мере, 85% идентичности с SEQ ID NO: 8, где остаток в положении 95 представляет собой Cys, и первый домен VL, имеющий, по меньшей мере, 85% идентичности с SEQ ID NO: 4, и второй домен VH, имеющий, по меньшей мере, 85% идентичности с SEQ ID NO: 26 или SEQ ID N: 46, и второй домен VL, имеющий, по меньшей мере, 85% идентичности с SEQ ID NO: 24 или SEQ ID N: 48, причем указанное биспецифичное Ab обладает специфичностью в отношении внеклеточной части S5-поры hERG1 и в отношении β1-интегрина.

Молекула bsAb или анти-hERG1 по изобретению полезна в качестве диагностического или терапевтического средства.

Диагностический инструмент согласно изобретению предназначен для обнаружения *in vitro* hERG1 (например, в хирургических образцах или биопсиях), содержит анти-hERG1-Cys scFv и/или биспецифичное Ab (предпочтительно в виде scDb) согласно изобретению, либо немеченое, либо связанное с флуорофором, предпочтительно флуорофором Alexa 488.

Таким образом, объект настоящего изобретения также представляет собой набор для диагностики *in vitro* (IVD), содержащий части для одновременного, отдельного или последовательного применения, причем указанный набор IVD включает:

- контейнер, содержащий анти-hERG1-Cys scFv, как описано выше; и/или
- контейнер, содержащий биспецифичное Ab, как описано выше

Предпочтительно набор IVD дополнительно включает контейнер, содержащий интактное моноклональное антитело, как описано в WO2016020483, в качестве референсного контроля.

Набор IVD может использоваться либо на образцах фиксированных тканей для методов иммуногистохимии (с результатами, которые будут доступны через 2-3 недели), либо на свежих биопсийных тканях (получаемых, например, с помощью эндоскопии или хирургии), для применения с методами иммунофлюоресценции, причем результаты доступны через 1 день.

Как описано выше, анти-hERG1-Cys scFv, меченное флуорофором (например, предпочтительно, Alex 750) или радионуклидом (например, предпочтительно, Tc99), представляет собой молекулу для применения при ранней диагностике hERG1-положительных видов онкологических заболеваний *in vivo* (у людей) и представлено анти-hERG1-Cys scFv. Анти-hERG1-Cys sc-FV антитело согласно изобретению имеет специфическую молекулярную структуру, обеспечивающую быстрое проникновение в раковую ткань, быстрое связывание с биомаркером hERG1 и быструю элиминацию, что делает его, при связывании с радионуклидом, идеальной молекулой для получения раннего *in vivo* (у людей) диагноза hERG1-положительного рака. Применение за одно введение и быстрый период полувыведения, 3,5 часа молекулы без системной токсичности при внутривенном введении в дозе 8 мг/кг и отсутствие изменений на ЭКГ (см. Фигуру 19) позволяют не взаимодействовать с клетками сердца. Наконец, оказалось, что анти-hERG1-Cys scFv имеет очень хорошее соотношение опухоль/ткань при внутривенном введении в дозе 1 мг/кг у мышей, несущих ксенотрансплантированный рак поджелудочной железы в поджелудочной железе.

Терапевтические средства: Молекула биспецифического антитела в соответствии с изобретением, специально разработанная для ингибирования злокачественного молекулярного комплекса hERG1/бета1 интегрин в терапевтических целях, представляет собой одноцепочечное биспецифическое антитело (одноцепочечное диатело, scDb), которое способно селективно связываться с hERG1 при экспрессии с бета1 интегрином на раковых клетках, без взаимодействия с сердцем. ScDb согласно изобретению представляет собой идеальную молекулу, которую следует использовать для повторного (постоянного) введения пациентам с hERG1-положительным раком, не вызывающих опасений по поводу безопасности сердца, с терапевтическим потенциалом как на ранней, так и на поздней/метастатической стадии, как в качестве отдельного агента, так и в качестве агента комбинированной терапии, для добавления к химиотерапии, облучению, таргетной терапии и иммуноонкологической терапии. Обоснование комбинированной терапии

заключается в том, что пути, конституционально активируемые в раковых клетках за счет избыточной экспрессии молекулярного комплекса hERG1/бета1 интегрин, являются комплементарными и интегративными для путей, на которые в настоящее время нацелены доступные лекарственные средства. Кроме того, канцерогенный путь с участием hERG1/бета1 интегрин может представлять собой механизм ускользания опухоли от надзора в сравнении с доступными в настоящее время методами лечения. Оказалось, что анти-hERG1/бета1 интегрин scDb имеет период полувыведения примерно 12 часов, без системной токсичности при внутривенном введении в дозе 8 мг/кг и без изменений на ЭКГ (см. Фиг. 20). Наконец, оказалось, что анти-hERG1/бета1 интегрин scDb обладает очень хорошей терапевтической эффективностью при введении в дозе 1 мг/кг два раза в неделю шесть раз у мышей с ксенотрансплантированным раком поджелудочной железы в поджелудочной железе.

Патологии, которые можно диагностировать или лечить с использованием bsAb или молекулы согласно изобретению, представляют собой все патологии, характеризующиеся сверхэкспрессией или неправильной экспрессией белка hERG1. Среди указанных патологий можно назвать опухоли, неврологические заболевания, эндокринные заболевания и нейроэндокринные заболевания.

BsAb или молекула в соответствии с изобретением, в частности анти-hERG1-Cys scFv или scDb, также могут быть использованы в качестве фармацевтического вектора доставки: так, например, она может быть ковалентно или нековалентно связана с радионуклидом, ферментом, лекарственными средствами или токсином.

Таким образом, дополнительным объектом настоящего изобретения также является фармацевтическая композиция, содержащая bsAb или молекулу в соответствии с изобретением и, по меньшей мере, другой фармацевтически приемлемый ингредиент.

Еще одним объектом настоящего изобретения является также последовательность нуклеотидов, кодирующих биспецифичное Ab или молекулу анти-hERG1 по изобретению. Подходящие степени гомологии (например, по меньшей мере, 85%) с кодирующими последовательностями, которые позволяют получать молекулу согласно изобретению, предназначены для включения.

Молекула согласно изобретению может быть предпочтительно получена с использованием нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 2, кодирующих соответственно VH (SEQ ID NO: 8) и VL (SEQ ID NO: 4).

Особенно предпочтительным согласно изобретению является способ получения анти-hERG1-Cys scFv согласно изобретению, причем указанный способ включает применение нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 9, кодирующей анти-hERG1-

Cys scFV, имеющей SEQ ID NO: 10.

ScDb-hERG1- β 1 по изобретению предпочтительно получают с применением нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 23 или SEQ ID N: 47 и SEQ ID NO: 25 или SEQ ID N: 45, кодирующих соответственно анти-hERG1-Cys VH (SEQ ID NO: 8), анти-hERG1-Cys VL (SEQ ID NO: 4), анти- β 1-интегрин VL (SEQ ID No: 24 или SEQ ID N: 48) и анти- β 1-интегрин VH (SEQ ID No: 26 или SEQ ID N: 46). Предпочтительно домены собраны в следующем порядке: анти-hERG1-Cys VH (SEQ ID NO: 8), анти- β 1-интегрин VL (SEQ ID No: 24 или SEQ ID N: 48), анти- β 1-интегрин VH (SEQ ID No: 26 или SEQ ID N: 46) и анти-hERG1-Cys VL (SEQ ID NO: 4).

Особенно предпочтительным в соответствии с изобретением является способ получения scDb-hERG1- β 1 в соответствии с изобретением, причем указанный способ включает использование нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 29, кодирующей scFV против hERG1-Cys, имеющего SEQ ID NO: 30.

Способ согласно изобретению подразумевает рекомбинантные методики.

Следовательно, объектом настоящего изобретения являются также экспрессирующий вектор или плазмида, содержащая последовательность нуклеотидов, кодирующих биспецифичное Ab или молекулу согласно изобретению, предпочтительно содержащую SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 2, а также генетически модифицированные микроорганизмы или клетка, содержащие экспрессирующий вектор по изобретению. Вышеуказанный экспрессирующий вектор или плазмида также могут содержать SEQ ID NO: 23 или 47 и SEQ ID NO: 25 или 45.

Настоящее изобретение может быть лучше понято в свете экспериментального раздела ниже.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - электрофореграммы, полученные для секвенирования ДНК четырех колоний после мутагенеза, выполненного на конструкции scFv-hERG1, показывающие правильную мутацию с Phe на Cys.

Фиг. 2 - (A): дрожжевая экспрессия scFv-hERG1. Слот-блот на надосадочных жидкостях, собранных путем индукции клонов scFv-hERG1-G3 *Pichia Pastoris* через 24 часа, 48 часов и 72 часа.

Были проанализированы клоны C7, C12, D9, E8, G3, G7 и отрицательный контроль нетрансформированного штамма *Pichia* GS115. Окрашивание проводили с использованием хромогена DAB. G3 показан как лучший экспрессирующий клон. (B): Вестерн-блоттинг, проведенный на очищенных образцах шести клонов. G3 показал самый высокий уровень экспрессии, в то время как у клона G7 экспрессия почти не была

обнаружена. (C): Слот-блот на надосадочных жидкостях, собранных путем индукции клонов scFv-hERG1-D8Cys *Pichia Pastoris* через 24 часа, 48 часов и 72 часа. Были проанализированы клоны B11, C3, D8, D9, G4, G10 и отрицательный контроль нетрансформированного штамма *Pichia* GS115. Окрашивание проводили с использованием хромогена DAB. D8 показан как лучший экспрессирующий клон. (D): Вестерн-блоттинг, проведенный на очищенных образцах шести клонов. D8 был клоном, который показал самый высокий уровень экспрессии, в то время как более низкая экспрессия была обнаружена для клона C3.

Фиг. 3 - (A) SDS-PAGE очищенных фракций элюции scFv-hERG1-G3 и scFv-hERG1-D8Cys; (B) гель-фильтрационная хроматография обоих очищенных антител с использованием Superdex 75 HR 10/30. (C) тест стабильности антитела scFv-hERG1-D8Cys. SDS-PAGE с последующим окрашиванием Кумасси бриллиантовым голубым представлены на снимке в разные моменты времени (через 0, 6, 12 и 18 месяцев после очистки белка).

Фиг. 4 - (A) Иммунофлуоресценция, проведенная на фиксированных и живых клетках HEK293Mock и HEK293-hERG1, с использованием как немеченого (I. IF), так и меченого антитела scFv-hERG1-G3 (D.IF). Репрезентативные изображения, полученные при 20-кратном увеличении, окрашенные ядра представлены синей флуоресценцией, окрашенные мембраны представлено зеленым окрашиванием (Alexa 488).

(B) Иммунофлуоресценцию проводили на фиксированных и живых клетках HEK293-Mock и HEK293-hERG1, с использованием как немеченого (I. IF), так и меченого антитела scFv-hERG1-D8-Cys (D.IF). Репрезентативные изображения, полученные при 20-кратном увеличении, окрашенные ядра представлены синей флуоресценцией, окрашенные мембраны представлено зеленым окрашиванием (Alexa 488).

(C) Графики, показывающие интенсивность IF (A.U.), рассчитанную с использованием программного обеспечения Image J (ImageJ 1.38, U.S. Национальные институты здоровья). Для каждого изображения среднее значение интенсивности флуоресценции трех разных областей рассчитывали после вычитания значений синих каналов (что относится к окрашиванию ядер).

Во всех экспериментах результаты на HEK 293-hERG1 были значительно выше по сравнению с результатами, полученными на HEK 293-Mock. Статистический анализ проводился для оценки допущений о нормальности и гомоскедастичности данных с использованием теста Шапиро-Уилка, а дисперсия анализировали с помощью ANOVA. Значимость парных волн оценивали с использованием t-критерия Стьюдента или критерия Бонферрони (* $p < 0,05$).

Фиг. 5 - Анализ жизнеспособности с трипановым синим, выполненный на HCT-116, MDA MB-231, MIA PACA2, HEK 293 HERG1, HEK-MOCK, FLG 29.1, PANC-1, BxPC-3, с использованием моноклонального антитела против hERG1 (100 мкг/мл) и scFv-hERG1-D8Cys (10; 20 мкг/мл). Все эксперименты были выполнены в трех повторах.

Фиг. 6 - Панель А: тестировали сфероиды HEK 293 HERG1 10, 20 и 40 мкг/мл scFv-hERG1-D8Cys. Объем сфероидов, обработанных 20 мкг/мл и 40 мкг/мл scFv-hERG1-D8Cys, меньше (см. пунктирные и штрих-пунктирные линии, соответственно) по сравнению с контролем (сплошная линия) в каждый момент времени. Вместо этого на панели В показана кривая роста сфероидов HEK-MOCK (не экспрессирующих hERG1), в которой не было обнаружено различий для обработанных сфероидов при всех трех протестированных концентрациях scFv-hERG1-D8Cys по сравнению с контролем. Панели А и В также показывают репрезентативное изображение в светлом поле контрольных сфероидов HEK293-hERG1 и HEK-MOCK соответственно, по мере их появления после 72 ч культивирования. Панель С. Сфероиды протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. На панели С показано влияние, оказываемое на клетки протоковой аденокарциномы поджелудочной железы MIA Pasa 2. Уменьшение объема сфероидов наблюдалось как для клеток, обработанных 20 мкг/мл, так и для 40 мкг/мл scFv-hERG1-D8Cys, с более выраженным эффектом, полученным при самой высокой протестированной концентрации (штрих-пунктирная линия) по сравнению с контролями в каждый момент времени. Также снимки, сделанные через 72 часа, показанные на правой стороне панели, показывают значительное уменьшение объема сфероида для клеток, обработанных антителом scFv-hERG1-D8Cys 40 мкг/мл (см. правое изображение), по сравнению с контролем (см. левое изображение). Панель D - клетки рака молочной железы, сфероиды MDA-MB 231: заметный эффект уменьшения объема наблюдается для всех трех концентраций scFv-hERG1-D8Cys (10, 20, 40 мкг/мл) по сравнению с контролем. Сделать вывод об уменьшении объема также можно сделать из изображений сфероидов MDA-MB 231, приведенных на правой стороне фигуры.

Фиг. 7 - Анализ жизнеспособности клеток Calcein AM, выполненный на сфероидах через 72 часа. Зеленое окрашивание представляет живые клетки, в то время как красное окрашивание представляет мертвые клетки. Изображение слева (панель А) представляет собой изображения контроля для каждой клеточной линии, в то время как справа (панель В) есть изображения сфероидов, обработанных 40 мкг/мл scFv-hERG1-D8Cys. Из изображения можно отметить уменьшение объема для сфероидов, обработанных антителом, особенно для сфероидов MIA Pasa 2, MDA MB-231 и PANC-1 и, кроме того, увеличенное количество мертвых клеток, особенно для MDA MB-231 и сфероидов PANC-

1, обработанных scFv-hERG1-D8Cys.

Фиг. 8А - нуклеотидная последовательность анти-b1-интегрин доменов VL и VH (TS2/16) (SEQ ID No: 23 и 25) получена службой автоматического секвенирования ДНК (PRIMM). Подчеркнутым курсивом показана последовательность VL, курсивом VH последовательность.

Фиг. 8В - нуклеотидная последовательность доменов VL и VH анти-b1-интегрин (BV7) (SEQ ID No: 45 и 47). Жирным шрифтом выделены праймеры, используемые для выделения одиночных доменов, тогда как серым цветом выделена область VH-последовательности, которая неизвестна, но в результате необходима для правильной рамки.

Фиг. 9 - Верхние панели: схематическая структура двух одноцепочечных антител, анти-hERG1 и анти-TS2/16. Нижние панели: схематическая структура scDb-hERG1- β 1.

Фиг. 10 - Схема, представляющая метод SOE-PCR для сборки анти-b1-интегрин scFv в порядке VL-линкер-VH.

Фиг. 11 - Панель А показывает окрашивание Кумасси очищенных надосадочных жидкостей, полученных в результате индукции шести клонов в малом масштабе, выращенных после трансформации анти-hERG1-Phe- β 1-scDb конструкцией. Обнаружена одна полоса, соответствующая клону G5 с молекулярной массой около 60 кДа, что соответствует ожидаемой.

На панели В показана хроматограмма, полученная после очистки надосадочной жидкости, полученной в результате крупномасштабной экспрессии клона G5: виден один единственный пик, и элюции, лежащие под синей областью, были проанализированы, а окрашивание Кумасси, представленное на панели С, демонстрирует полосы с надлежащей молекулярной массой во всех проверенных элюциях.

Фиг. 12 - Панель А. Результаты клеточного ELISA, проведенного на клетках HEK 293 HERG1 с использованием различных количеств биспецифического анти-hERG1-Phe- β 1-scDb антитела.

Фиг. 13 - непрямой IF, выполняемый на клетках, высеянных на разные субстраты, BSA и фибронектин (FB). IF показывает более сильный сигнал для клеток HEK 293 HERG1, покрытых FB, по сравнению с сигналом, полученным для клеток, покрытых BSA.

Фиг. 14 - непрямой IF, выполняемый на клетках HEK 293 HEKG (панели А и В). Окрашивание клеток после введения избытка пептида S5PORO показано на панелях D и E. На панели С представлены контрольные клетки, окрашенные только вторичными антителами.

Фиг. 15 - Экспрессия и очистка scDb-hERG1-Cys- β 1. Панель А. Хроматограмма,

полученная в результате очистки надосадочных жидкостей *Pichia Pastoris*. Панель В. Окрашивание Кумасси, показывающее анализ элюции при очистке scDb-hERG1-Cys- β 1, в пределах синего пика хроматограммы.

Фиг. 16 - прямой IF с scDb-hERG1-Cys- β 1-Alexa488. В этих конкретных экспериментах клетки инкубировали с антителом scDb, непосредственно конъюгированным с флуорофором Alexa 488. Клетки GD25 WT (отрицательные по экспрессии hERG1 и β 1-интегрина) инкубировали с антителом scDb-hERG1-Cys- β 1, непосредственно меченным флуорофором Alexa488. Сигнал отсутствует. Панель В. Клетки HEK 293 HERG1, высеянные на фибронектин (FN) и BSA и окрашенные scDb-hERG1-Cys- β 1-Alexa488: как показано на гистограмме, сигнал выше (~ 17 A.U.) в клетках, посеянных на FN, по сравнению с клетками, посеянными на BSA ($\square 10$ A.U.). Панель С. Клетки HEK 293 WT, высеянные на FN и BSA и инкубированные с scDb-hERG1-Cys- β 1-Alexa488: сигнал ниже для клеток, высеянных на BSA (~ 7 A.U.), по сравнению с клетками, посеянными на FN ($\square 12$ A.U.). Как можно понять из панелей В и С, значения флуоресценции ниже для клеток HEK 293 HERG1 на FN (~ 17 A.U.) по сравнению с клетками HEK 293 WT, посеянными на FN (~ 12 A.U.).

Фиг. 17 - определение IC₅₀ на клетках MDA-MB 231 и PANC-1. Влияние на жизнеспособность клеток было очевидно при 24 мкг/мл для клеток PANC-1 и 42 мкг/мл для клеток MDA-MB 231.

Фиг. 18 Эксперименты с латеральной подвижностью на клетках HCT 116, MDA-MB 231 HERG1, MDA-MB 231 и PANC-1. Четкое снижение MI (индекса подвижности) показано в клетках, обработанных scDb-hERG1-Cys- β 1, по сравнению с контрольными клетками. Более выраженный эффект сообщается для MDA-MB 231 HERG1 по сравнению с клетками MDA-MB 231, что свидетельствует о влиянии hERG1 на подвижность клеток. Эксперименты по латеральной подвижности, выполненные на клетках PANC-1, показали более низкий MI на обработанных клетках по сравнению с контролем. Эксперименты по латеральной подвижности, выполненные на клетках HCT116, показали более низкий MI на обработанных клетках по сравнению с контролем.

Фиг.19 (А) Фармакокинетика scFv-hERG1-D8Cys у мышей путем внутривенного введения ($n = 2$). Концентрацию антител определяли с помощью ELISA, дозируя концентрации в образцах плазмы крови мышей, взятых через 5, 15, 30 мин и 1, 2, 6, 24 и 48 ч после инъекции scFv. $t_{1/2} = 3,5$ ч. Значения представляют собой средние значения двух измерений $\pm$ SD.

(В) ЭКГ, регистрация электрокардиограммы. Измерения ЭКГ приведены на левой панели для контрольной мыши, которой вводили физиологический раствор PBS,

скорректированное значение интервала QT составляет 86 мс. На правой панели показан график ЭКГ, полученный после введения scFv-hERG1-D8Cys, без значительных изменений по сравнению с контролем с установленным значением интервала QT 90 мс.

(C) анализ *in vivo*. Каждая панель сообщает о флуоресцентном сигнале репрезентативной мыши, обработанной антителом scFv-hERG1-D8Cys, конъюгированным с Alexa750, по сравнению с контрольной мышью, обработанной раствором PBS. Максимальный обнаруженный сигнал был через 10 минут после инъекции; и не было обнаружено флуоресцентного сигнала через 24 часа после внутривенного введения.

(D) поглощение scFv-hERG1-D8Cys-Alexa750 и удержание scFv-hERG1-D8Cys-Alexa750 в мышинной модели PDA MIPaCa-2-nu/nu. Мышам вводили путем инъекции в хвостовую вену 6,5 мкг антитела scFv-hERG1-D8Cys-Alexa750. Репрезентативные фотографии мышей в.в. инъецированных мечеными антителами (слева) сравнивали с контрольными мышами (справа). Была проанализирована интенсивность флуоресценции в брюшной области, участок, ближайший к опухоли. Спектры флуоресцентного излучения измеряли с использованием фотонного сканера (Biospace Lab), изображения получали в разные моменты времени, каждые 5 минут, начиная с 5 минут после инъекции и до 60 минут после инъекции.

Фиг. 20. (A) Фармакокинетика scDb-hERG1-Cys- β у мышей путем внутривенного введения ($n = 2$). Концентрацию антител определяли с помощью ELISA, дозируя концентрации в плазме крови мышей, взятых через 5, 15, 30 мин и 1, 2, 6, 24 и 48 ч после инъекции scDb. $t_{1/2} \approx 12$ ч Значения представляют собой средства двух измерений $\pm$ SD.

(B) ЭКГ, регистрация электрокардиограммы. График ЭКГ, полученный после введения антитела scDb-hERG1-Cys- β 1, не показывает значительных изменений по сравнению с контрольным графиком, представленным на Фиг. 20B, со скорректированным значением интервала QT 83 мс, сравнимым с контролем.

(C) Таблица, показывающая объем поджелудочной железы (мм³) у мышей с опухолями MIPaCa-2-nu/nu, получавших и не получавших антитело scDb-hERG1-Cys- β 1. Также представлены данные о метастатической диффузии, % некротической площади на предметном стекле и числе сосудов.

(D) Изображения поджелудочной железы после некротоскопии: 1, без обработки; 2, обработанной тремя дозами антитела scDb-hERG1-Cys- β 1; 3, обработанной шестью дозами антитела scDb-hERG1-Cys- β 1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1. Мутагенез scFv-hERG1

Аминокислотная последовательность молекулы scFv hERG1, как описано в

WO2016020483 (A1), содержит аминокислоту Phe в положении 95 домена VH. Нуклеотидная последовательность SEQ ID No: 1 обнаружила присутствие Т в положении 283 (с283Т) домена VH. Согласно настоящему изобретению замена G была введена вместо Т в положении 283 (с283Т> G) домена VH, что привело к переключению Phe (TTT) в положении 95 на Cys (TGT). Эта мутация привела к введению одной аминокислоты (Cys) в положение между каркасом 3 и CDR3, что неожиданно привело к фундаментальному образованию дисульфидной связи в вариабельном домене иммуноглобулина. Cys был введен в оригинальную конструкцию, что является ориентиром для протокола мутагенеза (см. Материалы и методы). кДНК, полученную из четырех мутагенизированных колоний scFv-hERG1, секвенировали, и результаты секвенирования (Фиг.1) продемонстрировали правильную мутацию с TTT на TGT в положении с283Т>G, что указывает на желаемую мутацию с Phe на Cys.

2. *Экспрессия и очистка белка*

Плазмиды, scFv-hERG1 и мутагенизированный scFv-hERG1 (далее называемый scFv-hERG1-Cys), трансформировали в штамм-хозяин GS115 *P. pastoris*, используя технику сферопластирования. Было проанализировано шесть клонов (C7, C12, D9, E8, G3, G7) среди трансформантов scFv-hERG1 и шесть (B11, C3, D8, D9, G4, G10) из scFv-hERG1-Cys. Результаты экспрессии в малом масштабе показаны на Фиг. 2 панели А и В для scFv-hERG1 и панели С и D для scFv-hERG1-Cys, соответственно. Все клоны продемонстрировали экспрессию белка после 72-часовой индукции (верхние панели), что также показано слот-блоттингом.

После очистки присутствие белка оценивали с помощью вестерн-блоттинга (панели В и D).

Два наиболее экспрессирующих клон были выбраны для двух антител: G3 для scFv-hERG1 (далее называемый scFv-hERG1-G3) и D8 для scFv-hERG1-Cys (называемый scFv-hERG1-D8-Cys).

Анализ экспрессии в большом масштабе показаны на Фигуре 3. Присутствие белка оценивали с помощью SDS-PAGE и окрашивания Кумасси бриллиантовым голубым. Фракции 11, 12, 13 (А, левая панель) соответствуют scFv-hERG1-G3; фракции 12, 13, 14 (В, правая панель) соответствуют scFv-hERG1-D8Cys. Видны полосы, соответствующие молекулярному размеру обоих антител (около 30 кДа). При сравнении выходов двух белков, scFv-hERG1-G3 и scFv-hERG1-D8Cys, были обнаружены существенные различия: концентрация scFv-hERG1-G3 составляла 0,050 мкг/мкл; Концентрация scFv-hERG1-D8Cys составляла 0,444 мкг/мкл.

БЕЛОК	Выход (мг/л)
ScFv-hERG1-G3	0200
ScFv-hERG1-D8Cys	1

^a Выходы были нормализованы до мг белка на литр дрожжевой культуры *Pichia Pastoris*.

3. *Сравнение аффинности антигена между scFv-hERG1-G3 и scFv-hERG1-D8Cys*

Хроматограммы, представленные на Фиг. 3 (панели В), показывают результаты, полученные при гель-фильтрации. Эксклюзионная хроматография (SEC) была выполнена для того, чтобы исследовать возможное присутствие агрегатов, которые могут повлиять на связывающую способность двух антител. Несколько агрегатов обнаруживаются в анализе, представленном в В (левая панель), который относится к scFv-hERG1-G3; при этом scFv-hERG1-D8Cys (В, правая панель) представлен в мономерной форме.

4. *Тест стабильности антитела scFv-hERG1-D8Cys*

Стабильность антитела scFv-hERG1-D8Cys оценивали непосредственно, анализируя белок посредством окрашивания SDS-PAGE Кумасси бриллиантовым голубым в разные моменты времени (6, 12, 18 месяцев) после очистки. Данные на Фиг. 3С показывают, что во все моменты времени видна только одна аккуратная одиночная полоса, что указывает на то, что белок сохраняет свою стабильность, не показывая признаков деградации.

5. *Оценка иммунореактивности scFv-hERG1-G3 и scFv-hERG1-D8Cys*

Затем проводили иммунофлуоресцентный анализ с использованием scFv-hERG1-G3 и scFv-hERG1-D8Cys на фиксированных клетках, чтобы определить иммунореактивность двух антител. В качестве клеточной модели использовали НЕК 293, трансфицированные кДНК hERG1 (НЕК-hERG1) и, в качестве контроля НЕК-МОСК, которые не экспрессируют белок hERG1. Клетки НЕК-МОСК показали отсутствие или слабый сигнал с обоими антителами, в то время как hЕК 293 hERG1 показали хорошее мечение scFv-hERG1-G3, а еще лучше с scFv-hERG1-D8Cys (Фиг. 4, А и В). Анализ данных, полученных с использованием программного обеспечения ImageJ, представлен на графиках, приведенных на панели С. Значения, полученные при окрашивании scFv-hERG1-D8Cys, значительно выше в клетках, сверхэкспрессирующих hERG1, по сравнению со значениями контроля, полученного в клетках НЕК-МОСК.

Также была протестирована иммунореактивность двух антител после прямого

мечения флуоресцентной молекулой Alexa 488. Антитела scFv-hERG1-G3-Alexa488 и scFv-hERG1-D8Cys-Alexa488 тестировали в IF на фиксированных клетках (Фиг. 4, А и В), демонстрируя сохранение способности распознавать антиген в нативной конформации даже после сопряжения с флуорофором. Окрашивание IF измеряли с использованием программного обеспечения ImageJ, и результаты показаны на графиках, представленных на панели С. Сигнал, полученный на клетках HEK 293 HEK 293, сильнее по сравнению с контрольными клетками HEK-MOCK как для scFv-hERG1-G3-Alexa488, так и для scFv-hERG1-D8Cys-Alexa488.

Чтобы оценить и сравнить потенциальное применение *in vivo* scFv-hERG1-G3-Alexa488 и scFv-hERG1-D8Cys-Alexa488 в качестве молекулярных инструментов, оба антитела использовали для IF на живых клетках (Фиг. 4 А и В).

Эксперимент подтвердил результаты, полученные при окрашивании на фиксированных клетках; Клетки hEKG3 HEK293, по-видимому, имеют более сильный сигнал по сравнению с клетками отрицательного контроля HEK293 MOCK. Клетки hEK 293 HEK, по-видимому, имеют более специфическое пятнистое мечение клеток, в то время как клетки HEK-MOCK имеют неспецифический диффузный фон. По этой причине было представлено светлоскопическое изображение того же участка.

6. *Ингибирование жизнеспособности антителами scFv-hERG1-D8Cys и тест сфероидов*

На этой стадии было дополнительно изучено потенциальное свойство scFv-hERG1-D8Cys ингибировать рост клеток на панели неопластических клеточных линий. Как показано на Фиг. 5, значительное дозозависимое ингибирование пролиферации клеток наблюдалось для HCT-116, MDA-MB 231, Mia Paca-2, HEK 293 hERG1, PANC-1 и BxPc3. Клетки обрабатывали с использованием моноклонального антитела против hERG1 (100 мкг/мл) и scFv-hERG1-D8Cys (10; 20 мкг/мл). Как и ожидалось, не было обнаружено существенного снижения жизнеспособности клеток в клетках HEK-MOCK, которые не экспрессируют hERG1.

Чтобы исследовать влияние scFv-hERG1-D8Cys на трехмерную клеточную модель, мы протестировали три различные концентрации scFv-hERG1-D8Cys (10; 20; 40 мкг/мл) на сфероидах.

На Фигуре 6 показан график, демонстрирующий по оси Y объем сфероидов (мм³), тогда как по оси X сообщаются различные моменты времени (24 часа, 48 часов и 72 часа).

На Фиг. 6 на панели А представлен график, полученный для сфероидов, полученных из HEK293-hERG1. Объем сфероидов, обработанных 20 мкг/мл и 40 мкг/мл scFv-hERG1-D8Cys, меньше по сравнению с контролем в каждый момент времени.

Вместо этого на панели В показана кривая роста сфероидов НЕК-МОСК, в которой не было обнаружено различий для обработанных сфероидов при всех трех протестированных концентрациях scFv-hERG1-D8Cys по сравнению с контролем. Панели А и В также показывают репрезентативное изображение в светлом поле контрольных сфероидов НЕК293-hERG1 и НЕК-МОСК, соответственно, как они выглядят после 72-часового культивирования.

На панели С показано влияние, оказываемое на клетки протоковой аденокарциномы поджелудочной железы Mia Pasa 2. Уменьшение объема сфероидов наблюдалось как для клеток, обработанных 20 мкг/мл, так и для 40 мкг/мл scFv-hERG1-D8Cys, с более выраженным эффектом, полученным при самой высокой тестируемой концентрации по сравнению с контролями, в каждый момент времени. Изображения, сделанные через 72 часа, показанные в правой части фигуры, показывают снимок контрольного сфероида Mia Pasa 2, сделанный при 4-кратном увеличении; при этом на правом изображении показан снимок сфероида Mia Pasa2, обработанного scFv-hERG1-D8Cys 40 мкг/мл, сделанный при 10-кратном увеличении. На самом деле, невозможно было получить снимки сфероидов Mia Pasa 2 для контроля через 72 часа с 10-кратным увеличением, так как объем был слишком увеличен, чтобы обеспечить надлежащую фокусировку; в то время как сфероиды Mia Pasa 2 через 72 ч, обработанные scFv-hERG1-D8Cys, можно визуализировать с использованием 10-кратного увеличения, поскольку их объем по сравнению с контролем сильно уменьшен.

На панели D показаны сфероиды MDA-MB 231: заметный эффект уменьшения объема наблюдается для всех трех концентраций scFv-hERG1-D8Cys (10, 20, 40 мкг/мл) по сравнению с контролем. Сделать вывод об уменьшении объема также можно сделать из изображений сфероидов MDA-MB 231, приведенных на правой стороне фигуры.

На Фиг. 7 показаны результаты, полученные при анализе жизнеспособности клеток Calcein AM, проведенном на сфероидах через 72 часа. Зеленое окрашивание представляет живые клетки, в то время как красное окрашивание представляет мертвые клетки. Изображение слева (панель А) представляет собой изображения контроля для каждой клеточной линии, в то время как справа (панель В) есть изображения сфероидов, обработанных 40 мкг/мл scFv-hERG1-D8Cys. Из изображения можно отметить уменьшение объема для сфероидов, обработанных антителом, особенно для сфероидов Mia Pasa 2, MDA MB-231 и PANC-1 и, кроме того, увеличенное количество мертвых клеток, особенно для MDA MB-231 и сфероидов PANC-1, обработанных scFv-hERG1-D8Cys.

7. *scDb-hERG1-β1*

Было разработано биспецифическое антитело (bsAb), содержащее одноцепочечное антитело, направленное против β 1-интегрина (scFv-TS2/16) и scFv-hERG1-Cys или scFv-hERG1 (как описано выше).

Нуклеотидная последовательность, кодирующая домен VL TS2/16, представляет собой SEQ ID No: 23; нуклеотидная последовательность, кодирующая домен VH TS2/16, представляет собой SEQ ID No: 25 (см. Фиг. 8); соответственно, аминокислотная последовательность VL TS2/16 является SEQ ID No: 24, а аминокислотная последовательность VH TS2/16 является SEQ ID No: 26.

Формат биспецифического антитела представляет собой одноцепочечное диантитело (scDb), которое включает переменные домены (VH и VL) двух антител, связанных пептидными линкерами, как показано на Фиг. 9. На верхней панели фигуры представлены два одноцепочечных антитела, анти-hERG1 scFv и анти- β 1-интегрин TS2/16, scFv.

На нижней панели схематически представлена конечная структура биспецифического антитела анти-hERG1- β 1-интегрин, которая была собрана с использованием переменных доменов двух антител в следующем порядке: антитело VH scFv-hERG1 (SEQ ID No: 8 или SEQ ID No: 2), VL scFv-TS2/16 антитело (SEQ ID No: 24), VH scFv-TS2/16 антитело (SEQ ID No: 26), VL scFv-hERG1 антитело (SEQ ID No: 4).

Антитело VL scFv-TS2/16 (SEQ ID No: 24) и антитело VH scFv-TS2/16 (SEQ ID No: 26) связаны пептидным линкером.

Антитело VH scFv-hERG1 (SEQ ID No: 2 или 8) и антитело VL scFv-TS2/16 (SEQ ID No: 24) связаны пептидным линкером.

Антитело VH scFv-TS2/16 (SEQ ID No: 26) и антитело VL scFv-hERG1 (SEQ ID No: 4) связаны пептидным линкером

На 5' и 3' концах были вставлены сайты рестрикции FspI и AvrII (подчеркнуты ниже)

VL_{FspI}:

AAAATGCGCAGACTACAAAGATATTGTGATGACACAGAC (SEQ ID No: 27)

VH_{AvrII}:

GGGGCCTAGGATAGACAGATGGGGGTGTCGCGACACCCCCATCTGTCTAT
(SEQ ID No: 28).

Следующая последовательность (SEQ ID No: 29) является полной нуклеотидной последовательностью, кодирующей scDb-hERG1- β 1 (SEQ ID No: 30): при этом последовательность VH scFv-hERG1-Cys выделена серым цветом, последовательность VL scFv-TS2/16 выделена подчеркнутым курсивом, жирным шрифтом выделена последовательность линкера A, M, B, подчеркнутым жирным курсивом -

последовательность VH антитела scFv-TS2/16, подчеркнутым серым цветом - последовательность scFv-hERG1-Cys.

Мус-метка отмечена жирным курсивом, а His-метка - подчеркнутым жирным шрифтом. Сайты рестрикции подчеркнуты.

SEQ ID № 29:

GAGGCTGAGTGCGCAGACGAGGTCCAACAGTCTGGACCTGAACTGG
TGAAGCCTGGGGCTTCTGTGAAGATATCCTGCAAGACTTCAGGATACACATTCAGT
AATACACCGTTCAGTGGGTGAAACAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAATGGATTGGA
GGCATTAAATCCTAATGGTGGTACTACCTATAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCAC
ATTGACTATTGACAAGTCCTCCAGCTCAGCCTTCATGGAGCTCCGCAGCCTGACATC
TGAGGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAACAGGTTGGGGACCTGACTACTGGGGCCA
AGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCCCATCAGTCTATCCACT
GGCCCCTGGCTCGAGTGATATTGTGATGACACAGACTCCAACCACCATGGCTGCATCTC
CCGGGGACAAGATCACTATCACCTGCAGTGTGAGTTCAATTATAAGTTCCAATTACCTGCA
TTGGTATAGTCAGAAGCCAGGATTCTCCCCCTAACTCTTGATTTATAGGACATCCAATCTG
GCTTCTGGAGTCCCACCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACA
ATTGGCACCATGGAGGCTGAAGATGTTGCCACTTACTACTGCCAGCAGGGTTCTGATATTC
CACTCACGTTCCGGTGATGGGACCAAGCTGGACCTGAAACGGGGCTGATGCTGCACCAACT
GTATCCGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGGCGGCGGCTCCGGT
GGTGGTGGATCCGAGGTGAAGGTGGTGGAAATCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGG
AGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATACCATG
TCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTTCGCAACCATAAGTAGT
GGTGGTTCTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCCAGAG
ACAAAGCCAAGAACACCCTGTATTTGCAAATGGGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGC
CATGTATTACTGTACAAGAATAGGTTACGACGAAGATTATGCTATGGACCACTGGGGT
CAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATAGTG
CACTGGATATTGTGCTGACACAATCTCCACTCACTTTGTCGGTTAACATTGGTCAACC
AGCCTCTATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATACTAATGGAAAAACCTA
TTTTAATTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGT
GTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACAG
ATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATTTGGGAGTTTATTACTGCG
CGCAAGGTACACATTTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAAATCAAA
CGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCGCGGCCGCAGAAACAAAACTCATCTCAGAA
GAGGATCTGAATGGGGGCCCTAGGCATCATCACCATCACCATCATCACTAATAG

Последовательность была клонирована с использованием сайтов рестрикции,

указанных выше, в коммерчески доступный вектор pPIC9K (Life Technologies).

8. *scDb-hERG1-Phe-β1: экспрессия и характеристика*

Конструкция, экспрессирующая антитело против hERG1-Phe-β1-scDb, была клонирована в экспрессирующий вектор pPIC9K, который является вектором, подходящим для экспрессии в клетках дрожжей *Pichia pastoris*.

Штамм GS115 *Pichia pastoris* трансформировали в соответствии с протоколом сферопластирования, и 96 клонов подвергали скринингу на чашках с YPD-агаром, содержащих G418, для селекции. Шесть клонов затем индуцировали в небольшом масштабе и очищали с использованием шариков Sepharose Ni (GE Healthcare) с использованием гистидиновой метки, введенной с вектором pPIC9K. Окрашивание Кумасси показано на Фиг. 11, панель А, и оно демонстрирует одну полосу, выделенную стрелкой, с молекулярной массой (около 60 кДа), совпадающей с ожидаемой для анти-hERG1-Phe-β1-scDb антитела, соответствующего клону G5.

Затем была проведена крупномасштабная экспрессия клона G5 анти-hERG1-Phe-β1-scDb, адаптирующая протокол индукции для больших объемов культуры.

Надосадочную жидкость, полученную из 1 л культуры клеток *Pichia pastoris*, очищали с использованием АКТА Pure (GE Healthcare). Результаты представлены на Фиг.11, на которой показана как хроматограмма, полученная в результате очистки антител (панель В), так и окрашивание Кумасси (панель С), где были проанализированы элюции, лежащие под синей областью. В соответствии с тем, что ожидалось, для каждого элюирования была обнаружена одна полоса, соответствующая очищенному анти-hERG1-Phe-β1-scDb.

Анти-hERG1-β1-scDb фракции 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 18; 20 человек были собраны вместе и диализированы против PBS 1X. Таким образом, была начата детальная характеристика антитела.

Одной из важных стадий был выбор подходящей модели для тестирования анти-hERG1-Phe-β1-scDb антитела. Таблица ниже суммирует профиль экспрессии, связанный с hERG1 и β1-интегрином для клеточных линий, выбранных для экспериментов по характеристике.

Таблица 4 Профиль экспрессии HEK 293 HERG1, HEK 293 WT и GD25, относительно hERG1 и β1-интегрин

	ЭКСПРЕССИЯ HERG1	Экспрессия β1-интегрин
HEK 293 HERG1	+	+

	ЭКСПРЕССИЯ HERG1	Экспрессия β1-интегрина
НЕК 293 ДИКИЙ ТИП	-	+
GD25	-	-

BsAb сначала анализировали на клетках hEKG1 НЕК 293, которые экспрессируют оба антигена hERG1 и β 1. Проводили клеточный ELISA, результаты которого представлены на Фиг.12. Клеточный ELISA показал определенную дозозависимую пропорциональность для связывания с нативным антигеном, с более высоким OD450 для клеток, экспрессирующих оба антигена hERG1 и β 1, как и ожидалось.

Более того, биспецифическое антитело против hERG1- β 1-scDb показало способность связывать антиген в нативных условиях, как и в случае антигена, эндогенно экспрессируемого клетками. Специфичность связывания анти-hERG1-Phe- β 1-scDb биспецифического антитела также подтверждается сравнением одинакового количества (0,5 мкг) анти-hERG1-Phe- β 1-scDb и анти-scFv-hERG1-Phe, которое является одним из двух одноцепочечных антител, которые образуют биспецифическое антитело. Фактически, сигнал, полученный после инкубации с анти-hERG1-Phe- β 1-scDb, выше, чем сигнал, полученный с использованием анти-scFv-hERG1-Phe. Такой результат соответствует ожидаемому, поскольку сигнал, полученный с помощью анти-hERG1-Phe- β 1-scDb, является результатом связывания обоих антигенов, hERG1 и β 1; тогда как сигнал, полученный с использованием scFv-hERG1, является результатом только связывания с антигеном hERG1.

Также была оценена иммунореактивность анти-hERG1-Phe- β 1-scDb антитела с помощью IF на клетках, выращенных на субстратах BSA (Фиг. 13, панель А и В) и фибронектине (FN) (фиг. 13, панель С и D). Фактически было показано, что образование комплекса β 1 усиливается FN-зависимой активацией интегрин. Как видно из Фиг.13, на панелях С и D, отображается сильный мембранный сигнал в клетках HEK293-hERG1, высеванных на фибронектине, из-за строгого комплексообразования. Сигнал был проанализирован с использованием программного обеспечения ImageJ, и результаты представлены на графике.

Чтобы дополнительно подтвердить доказательства, полученные из предыдущих экспериментов, было оценено связывание анти-hERG1-Phe- β 1-scDb на клетках HEK293-hERG1, вводящих перед инкубацией антител избыток пептида S5PORO, на который было нацелено антитело scFv-hERG1. Как можно понять из Фиг. 14, панели А и В, на клетках HEK293-hERG1, инкубированных с анти-hERG1-Phe- β 1-scDb, подтверждается сигнал

благодаря связыванию как с hERG1, так и с β 1-интегрином. Панель С демонстрирует отрицательный контроль, тогда как панели D и E демонстрируют результаты, полученные после инкубации с пептидом S5PORO; ясно видно, что происходит снижение сигнала, что соответствует ожидаемому. Фактически, клетки HEK293-hERG1, которые являются положительными по обоим антигенам, после инкубации с пептидом демонстрируют снижение интенсивности окрашивания, вероятно, из-за насыщения сайтов связывания антигена hERG1; таким образом, сигнал, который является видимым, является сигналом, возникающим только в результате связывания с антигеном β 1. Такие результаты суммированы на графике, полученном из количественного определения интенсивности флуоресценции с помощью ImageJ.

9. *scDb-hERG1-Cys- β 1: экспрессия и характеристика*

Конструкция, экспрессирующая антитело scDb-hERG1-Cys- β 1, клонированное в экспрессирующий вектор pPIC9K, который является вектором, подходящим для экспрессии в клетках дрожжей *Pichia pastoris*, трансформированных в клетки дрожжей GS115.

Клоны, полученные в результате трансформации scDb-hERG1-Cys- β 1, были подвергнуты скринингу в соответствии с протоколом, ранее описанным для антитела scDb-hERG1-Phe- β 1.

Надосадочную жидкость, полученную из 1 л культуры клеток *Pichia pastoris*, очищали с использованием АКТА Pure (GE Healthcare). Результаты представлены на Фиг. 15, на которой показаны как хроматограмма, полученная в результате очистки антител (панель А), так и окрашивание Кумасси (панель В). Элюции, соответствующие синей области, были проанализированы, и, в соответствии с тем, что ожидалось, для каждой элюции была обнаружена единичная полоса с молекулярной массой примерно 60 кДа, соответствующая очищенному scDb-hERG1-Cys- β 1.

После успешной очистки белка антитело было проверено на прямую иммунофлуоресценцию (IF) после прямой конъюгации с Alexa488. Результаты представлены на Фиг. 16 для клеток GD25 WT, HEK 293 WT и HEK 293-hERG1. Изображения показывают, что клетки GD25 WT, панель А (отрицательные по экспрессии hERG1 и β 1-интегрина), не демонстрируют значительного окрашивания после инкубации с антителом scDb-hERG1-Cys- β 1, в то время как панель В показывает четкое мембранное окрашивание для клеток HEK 293-hERG1 (которые экспрессируют оба антигена), посеянные на фибронектин (FN), который усиливает образование комплекса hERG1- β 1, с более высоким значением сигнала флуоресценции ($\square$ 17 A.U.) по сравнению с клетками, посеянными на BSA, используемыми в качестве контроля ($\square$ 10 A.U.). Панель С

показывает флуоресцентное окрашивание, полученное на клетках HEK 293 WT (которые экспрессируют только $\beta 1$ -интегрин), показывая более высокие значения сигнала флуоресценции для клеток, посеянных на FN ($\square$ 12 A.U.), по сравнению с клетками, посеянными на BSA ($\square$ 7 A.U.). IC₅₀ было определено для обеих клеточных линий, как показано на Фиг.17, панели А и В. Влияние на жизнеспособность клеток было очевидно при 24 мкг/мл для клеток PANC-1 и 42 мкг/мл для клеток MDA-MB 231. Такие результаты согласуются с паттерном экспрессии hERG1, экспрессия которого преобладает в клетках PANC-1, по сравнению с клетками MDA-MB 231.

Соответственно, было протестировано влияние scDb-hERG1-Cys- $\beta 1$ на миграционное поведение раковых клеток посредством анализа латеральной подвижности. Эксперименты были выполнены на клетках MDA-MB 231, MDA-MB 231-hERG1, PANC-1 и HCT116. Результаты представлены на графиках на Фиг. 18. Наблюдается явное снижение индекса подвижности (MI) в обработанных клетках по сравнению с контролем. Такой эффект более выражен в отношении MDA MB 231-hERG1 по сравнению с клетками MDA-MB 231, что свидетельствует о hERG1-зависимом влиянии антитела на миграцию клеток.

Обнадеживающие результаты были также получены на клетках PANC-1 и HCT116 с уменьшением подвижности в обработанных клетках по сравнению с контролем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

10. *Клонирование тяжелой и легкой цепи антитела к hERG1.*

Тяжелая и легкая цепь моноклонального антитела против hERG1 (hERG1-mAb) были выделены из кДНК, полученной из мРНК, очищенной из гибридом, выделяющих hERG1-mAb. Для амплификации областей VH и VL, были выбраны 5' праймер, который гибридизуется на каркасе 1 (FR1) варибельного домена каждой цепи (прямой праймер), и праймер, который гибридизуется на константной области рядом с варибельным доменом каждой цепи (обратный праймер). Для VL был разработан вырожденный праймер, который гибридизуется на каппа-легкой цепи, поскольку это фенотип иммуноглобулина, более выраженный у мышей (Honjo and Alt, 1995). Тяжелую цепь (VH) антитела амплифицировали с помощью ПЦР с использованием следующего набора праймеров: degVH вперед, 5 'GAGGTCCARCTGCAACARTC 3' (SEQ ID No: 11) и IgG2 обратный, 5 'AGGGGCCAGTGGATAGACTGATGG 3' (SEQ ID No: 12) (Wang, 2000). Следующий набор праймеров использовали для ПЦР-амплификации легкой цепи (VL) антитела: degVL (K), 5 'GAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA 3' (SEQ ID No: 13) и K обратный, 5 'GGATACAGTTGGTGCAGCATC 3' (SEQ ID No: 14) (Wang, 2000). кДНК амплифицировали с использованием высококачественной ДНК-полимеразы Phusion®

(реагенты Finnzymes). Условия проведения циклов: начальное плавление при 94 °C в течение 2 мин, а затем 25 циклов трехступенчатой программы (94 °C, 30 с; 56 °C (VH); 48 °C (VL), 1 мин и 72 °C, 1 мин. Реакции затем проводили при 72 °C в течение 10 мин и охлаждали до 4 °C.

Фрагменты антител (VH и VL), выделенные из электрофореза в агарозном геле, очищали с использованием набора для очистки QIAquick PCR Purification (QIAGEN) и затем вставляли в вектор pCR™-Blunt (Invitrogen), следуя инструкциям производителя. Рекомбинантную плазмиду секвенировали с помощью сервиса автоматического секвенирования ДНК (PRIMM).

Затем фрагменты VH и VL были клонированы в экспрессирующий вектор pHENIX, который содержит линкерную последовательность (Gly4Ser)₃ между двумя различными сайтами клонирования. Были сконструированы праймеры с соответствующими сайтами рестрикции для клонирования фрагментов антител в вектор pHenIX. Праймеры VL: прямой VL-ApaI, 5' 'acgcgtgcactgGATATTGTGCTGACACAATCTCCA 3' (SEQ ID No: 15); обратный VL-NotI, 5' 'ataagaatgcggccgcGGATACAGTTGGTGCAGCATC 3' (SEQ ID No: 16). VH праймеры: прямой VH-Salk, 5' 'acgcgtcgacGAGGTCCAACAGTC 3' (SEQ ID No: 17); обратный VH-XhoI, 5' 'ccgctcgagccAGGGGCCAGTGGATAGACTGATGG 3' (SEQ ID No: 18). Продукты ПЦР расщепляли либо рестриктазами ApaI и NotI (для VH), либо SalI и XhoI (для VL) (New England BioLabs) и лигировали в вектор pHENIX в совместимых сайтах клонирования. Гидролиз проводили 2 ч при 37 °C. Чтобы избежать повторного лигирования совместимых концов, 5'-фосфатную группу удаляли с 5'-конца вектора, используя фосфатазу кишечника теленка (CIP) в соответствии со следующим протоколом: вектор pHENIX (50 нг/мкл), буфер 3 (New England BioLabs) 1X и CIP (0,5 ед./Мкг вектора). Реакцию дефосфорилирования инкубировали в течение 1 часа при 37 °C. Фосфорилированный вектор очищали с помощью набора для очистки QIAquick PCR (QIAGEN).

Лигирование между фрагментом scFv-hERG1 и pHENIX проводили в смеси буфера 2 (New England BioLabs) и лигазы T4. В смеси для лигирования устанавливали соотношение вектор: scFv 1: 3 и 1:10, и проводили инкубацию 15 минут при 25 °C.

2 мкл смеси для лигирования электропорировали в клетки E. coli TOP10F' и HB2151 (импульс 2500 мВ). Электропорированные клетки извлекали с помощью 450 мкл среды SOC (среда SOB с добавлением 1 mM MgSO₄, 1 mM MgCl₂) и инкубировали 1 час при 37 °C при встряхивании. Бактерии высевали в предварительно прогретые чашки с LB-агаром, содержащие антибиотик, и инкубировали крышкой вниз в течение ночи при 37 °C.

11. Клонирование scFv-hERG1-G3 в экспрессирующий вектор pPIC9K

Экспрессирующую кассету scFv-hERG1 клонировали в трансформирующий вектор pPIC9K (любезно предоставлен профессором Ermanno Gherardi, Университет Павии), который содержит метку 6xHis. Конструкцию scFv выделяли и амплифицировали из вектора pHENIX с помощью ПЦР с использованием праймеров, которые обеспечивают добавление сайтов рестрикции FspI и AvrII соответственно на 3' и 5' концах последовательности (прямой VH-FspI, AAAATGCGCAGAGGTCCAACAGTC (SEQ ID No: 19); обратный VL-AvrII, GGGGCCTAGGGGATACAGTTGGTGCAGCATC (SEQ ID No: 20)).

Вектор pPIC9 состоит из промотора AOX1, терминатора транскрипции 3' AOX1 (TT) и сайта мультиклонирования, в который вставлен чужеродный ген.

Экспрессирующую кассету разрезали с помощью FspI и AvrII и клонировали в pPIC9K, разрезанную с помощью рестриктаз Eco53KI и AvrII (New England BioLabs).

12. Мутагенез scFv-hERG1

Мутагенез проводили на экспрессирующей кассете scFv-hERG1, клонированной в pPIC9K, с использованием набора для направленного мутагенеза QuikChange® XL (Stratagene, Agilent Technologies). Подходящие праймеры для введения аминокислоты Cys были сконструированы в соответствии с указаниями производителя и разработаны Primm Biotech, левый праймер: GGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAACAGGTTGGGGACCTG (SEQ ID No: 21); правый праймер: CAGGTCCCCAACCTGTTGCACAGTAATAGACTGCAGAATCC (SEQ ID No: 22)).

Образец реакции готовили следующим образом: 5 мкл 10X реакционного буфера; 1 мкл матрицы дцДНК scFv-hERG1 (13 нг/мкл); 1,84 мкл (125 нг) левого праймера; 1,84 мкл (125 нг) правого праймера; 1 мкл смеси dNTP; 3 мкл QuickSolution; 36, 32 мкл ddH₂O. Затем добавляли 1 мкл ДНК-полимеразы PfuTurbo (2,5 Ед/мкл). Условия проведения циклов были скорректированы: начальное плавление проводили при 95°C в течение 1 минуты, затем следовали 18 циклов трехступенчатой программы (95°C, 50 секунд; 60°C, 50 секунд и 68°C, 4 минуты). Затем реакционную смесь выдерживали при 68°C в течение 7 минут и охлаждали до 4°C.

После реакции амплификации 1 мкл рестриктазы DnpI (10 Ед/мкл) добавляли непосредственно к реакционной смеси, которую инкубировали сразу после этого при 37°C в течение 1 ч для гидролиза первичного.

На этом этапе бактериальные ультракомпетентные клетки DH5α трансформировали тепловым шоком. Клетки осторожно размораживали на льду и 2 мкл ДНК, обработанной DpI, переносили в отдельную аликвоту 200 мкл ультракомпетентных клеток. Реакционную смесь инкубировали на льду в течение 30 минут. Затем пробирку

подвергали тепловому импульсу при 42°C в сухой бане в течение 45 с. Пробирку инкубировали на льду в течение 2 мин. Клетки извлекали с помощью 450 мкл среды SOC (среда SOB с добавлением 1 mM MgSO₄, 1 mM MgCl₂) и инкубировали 1 час при 37°C при встряхивании. Бактерии высевали в предварительно нагретые чашки с LB-агаром, содержащие антибиотик ампициллин (50 мкг/мл), и инкубировали крышкой вниз в течение ночи при 37°C.

На следующий день выросло несколько колоний, и некоторые из них были отобраны, а ДНК была извлечена и секвенирована для проверки наличия желаемой мутации. Полученная конструкция была названа scFv-hERG1-Cys.

13. *Экспрессия scFv-hERG1-G3 и scFv-hERG1-D8Cys в Pichia Pastoris*

Линеаризованные scFv-hERG1 и scFv-hERG1-Cys гидролизовали с помощью SalI и трансформировали в штамм *Pichia Pastoris* GS115 путем сферопластирования с образованием трансформантов Mut⁺. При трансформации мы сверялись с указаниями набора *Pichia Expression Kit* (Invitrogen).

Через пять дней после трансформации отдельные колонии были видны невооруженным глазом, 92 клона и 4 отрицательных контроля были отобраны и перенесены в три разных 96-луночных планшета с различной концентрацией G418: без G418, 5 мг/мл, 15 мг/мл. Селекцию G418 проводили с использованием характеристики, согласно которой pPIC9K содержит бактериальный ген канамицина, который придает устойчивость к Geneticin® в *Pichia*. Уровень устойчивости к Geneticin® приблизительно зависит от количества интегрированных генов канамицина. Одна копия pPIC9K, интегрированная в геном *Pichia*, придает устойчивость к Geneticin® до уровня ~ 0,25 мг/мл. Множественные интегрированные копии pPIC9K могут повысить уровень устойчивости к Geneticin® с 0,5 мг/мл (1-2 копии) до 4 мг/мл (7-12 копий). Из-за генетической связи между геном канамицина и кассетой экспрессии (оба под промотором P_{AOX1}) можно сделать вывод, что устойчивые к Geneticin® клоны содержат несколько копий представляющего интерес гена. По этой же причине экспрессия секретируемого белка может увеличиваться из-за эффекта дозы гена. Таким образом, присутствие pPIC9K использовалось в качестве инструмента для выявления трансформантов pPIC9K, которые содержат множество копий представляющих интерес генов, scFv-hERG1 и scFv-hERG1-Cys.

После двух дней роста при 30 °C шесть наиболее выращенных клонов из чашек G418 с концентрацией 15 мг/мл отбирали и оценивали по их способности экспрессировать интересующий белок, создавая жидкую культуру небольшого масштаба, согласно протоколу набора *Pichia Expression Kit* (Invitrogen).

Образцы из культуры каждого клона собирали в разные моменты времени: 24 часа, 48 часов, 72 часа. После трех дней индукции 100% метанолом с 0,5% конечной концентрацией надосадочные жидкости собирали и тестировали с помощью блоттинга.

14. *Слот-блот анализ*

Дрожжевые надосадочные жидкости собирали и тестировали на экспрессию белка с помощью блоттинга; 200 мкл каждой надосадочной жидкости наносили на PVDF-мембрану (Amersham), помещенную в устройстве слот-блоттинга, между двумя квадратами ватмановской бумаги 3 мм. Образцы оставляли в инкубаторе на 15 минут, затем для сушки образцов применяли вакуум. Мембрану извлекали и промывали T-PBS. Блокирование осуществляли с помощью T-PBS 5% BSA в течение 45 минут, а затем промывали 10 минут с помощью T-PBS. Мембрану инкубировали в течение 1 часа с конъюгированным антителом против 6xHis-HRP (Sigma), разведенным 1: 2000, в 15 мл T-PBS 5% BSA.

15. *Очистка на Ni-сефарозе*

Надосадочные жидкости, полученные при скрининге клонов после дрожжевой трансформации, инкубировали в течение ночи перемешивая с Ni Sepharose 6 Fast Flow (Ge Healthcare) в соответствии с инструкциями производителя. После этого проводили две стадии промывания с помощью 500 мкл промывочного буфера (20 mM фосфата натрия, 500 mM NaCl, pH 7,3) и проводили элюирование с использованием 250 мкл буфера для элюции (20 mM фосфата натрия, 500 mM имидазола, pH 7,3).

16. *Очистка ÄKTA*

Очистку 1 литра дрожжевой надосадочной жидкости scFv-hERG1-G3 и scFv-hERG1-D8Cys, соответственно, выполняли с помощью аффинной хроматографии с использованием системы очистки белка ÄKTA (Ge Healthcare Life Sciences) с колонками HisTrap HP 1 мл. Стадии промывки и уравнивания выполняли в соответствии с инструкциями производителя, используя промывочный буфер (20 mM фосфат натрия, 500 mM NaCl, pH 7,3); элюирование проводили с использованием линейного градиента буфера для элюции (20 mM фосфат натрия, 500 mM NaCl, 500 mM имидазол, pH 7,3). Анализ проводили с использованием программного обеспечения UNICORN 7.0.

17. *Гель-фильтрация*

Образцы, полученные в результате очистки обоих антител, подвергали гель-фильтрации с использованием Superdex 75 HR 10/30 (Ge Healthcare Life Sciences). Состав промывочного буфера (20 mM фосфат натрия, 150 mM NaCl, pH 7,3) регулировали для оптимизации условий протокола. Элюции анализировали с помощью SDS-PAGE.

18. *Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия*

(SDS-PAGE)

Каждый образец наносили с одинаковым объемом 15 мкл на стеклинг-гель (400 мкл акриламида (40%) - бисакриамида (0,8%), 1 мл 0,5 М Трис-HCl, pH 6,8, 40 мкл 10% SDS, 20 мкл 10 % персульфата аммония, 4 мкл TEMED, 2,54 мл H₂O). Стекинг-гель добавляли на разделяющий гель (2,6 мл акриламида (40%) - бисакриамида (0,8%), 1,75 мл, 1,5 М трис-HCl, pH 8,8, 70 мкл 10% SDS, 35 мкл 10% персульфата аммония, 3,5 мкл TEMED, 2,55 мл H₂O). Электрофоретический прогон проводили при 150 В. Гели окрашивали Кумасси бриллиантовым голубым или переносили на мембраны из PVDF для вестерн-блоттинга для оценки присутствия белка (около 30 кДа).

19. Вестерн-блоттинг

После SDS-PAGE гели переносили на мембрану PVDF (Amersham) в буфере для переноса (14,4 г, 3,03 г TrisHCl, 200 мл метанола, 800 мл H₂O) при 100 В в течение одного часа. Мембраны отмывали в T-PBS (PBS 0,1% Tween) и затем блокировали T-PBS 5% BSA в течение ночи. Мембраны подвергали воздействию первичного антитела, связанного с перекисным окислением (Sigma), разведенного в T-PBS 5% BSA в течение одного часа при комнатной температуре. После трехкратной промывки мембран в течение десяти минут сигналы визуализировали с использованием реагента ECL (Amersham).

WB выполняли, используя следующие антитела: anti-myc (1: 1000) и антитело против 6xHis-HRP (Sigma).

20. Количественная оценка scFv-hERG1-G3 и scFv-hERG1-D8Cys, анализ ELISA и анализ Biacore.

scFv-hERG1-G3 и scFv-hERG1-D8Cys собирали вместе и диализовали против PBS 1X с использованием диализных кассет Slide-A-Lyzer™ (Thermo Fisher). Измеряли поглощение белка при 280 нм и применяли уравнение Ламберта-Бера.

Чтобы оценить, обладают ли два сконструированных антитела, scFv-hERG1-G3 и scFv-hERG1-D8Cys, способностью связывать антиген, а затем исследовать различную аффинность двух антител, анализы ELISA проводили с использованием планшетов, покрытых пептидом S5-поры (последовательность: EQPHMDSRIGWLHN), на который нацелено антитело. Этот пептид такой же, какой мы использовали для скрининга анти-hERG1 A7-антитела.

21. Мечение антител с помощью Alexa 488

scFv-hERG1-G3 и scFv-hERG1-D8Cys были конъюгированы с помощью набора для мечения белков Alexa Fluor® 488 Microscale Protein Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с указаниями протокола.

22. Иммунофлуоресценция на фиксированных клетках

HEK 293 hERG1 (HEK293, стабильно трансфицированные конструкцией кДНК pcDNA3.1-hERG1) и HEK-MOCK (HEK 293, стабильно трансфицированные кДНК pcDNA 3.1), выращивали в среде DMEM с 10% сывороткой FBS EU в инкубаторе при 37 °C с 5% CO₂. Клетки высевали на ночь на стеклянные покровные стекла и затем один раз промывали PBS и фиксировали 4% параформальдегидом в течение 20 минут при комнатной температуре. Блокирование осуществляли с помощью 10% BSA в течение 2 ч при комнатной температуре. Инкубацию антител проводили с использованием scFv-hERG1-G3, scFv-hERG1-D8Cys, разбавляли 1:20 в блокирующем растворе и инкубировали в течение 2 с половиной часов с последующей инкубацией против His (1: 250; Abcam) в течении ночи в блокирующем растворе. На следующий день клетки трижды промывали PBS и инкубировали с антителом с Alexa488 против мышиных антител (Invitrogen) в течение 1 часа.

При этом scFv-hERG1-G3-Alexa488 и scFv-hERG1-D8Cys-Alexa488, разведенные 1:20 в блокирующем растворе, инкубировали в течение ночи при 4 °C.

Для выявления клетки инкубировали с Hoechst (1: 1000) в течение 30 минут и затем заключали в пропилгаллат. Клетки визуализировали на конфокальном микроскопе (Nikon, C1).

Иммунофлуоресцентное количественное определение проводили с использованием программного обеспечения ImageJ: для каждого изображения выполняли измерение трех различных областей и вычисляли среднее значение.

23. *Иммунофлуоресценция на живых клетках*

Клетки выращивали в течение ночи на 60 мм чашках (Sarstedt) с использованием кольца агарозы (15 г/л), чтобы изолировать клетки и минимизировать объемы реагентов, необходимые для инкубации. Клетки инкубировали с scFv-hERG1-G3-Alexa488 и scFv-hERG1-D8Cys-Alexa488, разведенными 1:20 в полной культуральной среде в инкубаторе при 37 °C с 5% CO₂ в течение 4 часов. Выравнивание было выполнено с использованием Hoechst, как описано ранее. Клетки визуализировали с помощью инвертированной световой микроскопии (Nikon, Eclipse TE300).

24. *Жизнеспособность клеток*

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализа с трипановым синим; кратко клетки HCT-116, MDA-MB231, MIA PACA2, HEK293 hERG1, HEK-MOCK, FLG 29.1, PANC-1, BXPC3 при плотности 5×10^3 клеток/лунку высевали в 96-луночный планшет. Через 24 часа среду заменяли на 100 мкл свежей среды, содержащей различные концентрации антитела scFv-hERG1-D8Cys (10 мкг/мл и 20 мкг/мл). Полный иммуноглобулин, моноклональное антитело против hERG1, тестировали в концентрации

100 мкг/мл. Клетки культивировали 24 часа в увлажненном инкубаторе при 37 °C и 5% CO₂. После обработки клетки отделяли и подсчитывали жизнеспособные клетки. Эксперименты проводились в трех повторях.

25. *3D-культура сфероидов и тест scFv-hERG1 на сфероидах*

НЕК-293 hERG1, НЕК-МОСК, MDA-MB231, MIA PACA2 и PANC-1 высевали в 96-луночный планшет с плотностью 103 клеток/лунку для каждой лунки на 1,5% агарозном базовом слое. 100 мкл свежей среды добавляли в каждую лунку и клетки оставляли расти в течение 72 ч в инкубаторе при 37 °C с 5% CO₂. Через 72 часа сфероиды становились видными, и среду заменяли на 100 мкл свежей среды, содержащей различные концентрации антитела scFv-hERG1-D8Cys (10 мкг/мл, 20 мкг/мл и 40 мкг/мл).

Снимки были сделаны с использованием Nikon, Eclipse TE300 каждые 24 часа до 72 часов, когда был проведен анализ жизнеспособности клеток Calcein AM.

Объем сфероидов оценивали, анализируя снимки, сделанные через 24 часа, 48 часов и 72 часа с использованием программного обеспечения MATLAB.

Эксперимент проводился в трех повторях.

26. **β1-интегрин mAb: обратная транскрипция РНК**

РНК TS2/16 и BV7 подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием олиго (dT) праймеров (Invitrogen) и обратной транскриптазы SuperScript® II (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя в общем объеме 40 мкл.

<u>Компонент РНК</u>	<u>Концентрация стока</u>	<u>Конечная концентрация 100 нг/мкл</u>	<u>Количество 4 мкг</u>
Олиго (dT) 12-18	500 мкг/мл	25 мкг/мл	2 мкл
dNTPmix	10 mM каждый	0,5 mM	2 мкл
H ₂ O категории ПЦР	---	---	18 мкл

Смесь инкубировали в ПЦР-амплификаторе при 65°C в течение 5 минут, а затем быстро охлаждали на льду и добавляли следующие компоненты:

<u>Компонент</u>	<u>Стоковая концентрация 5x</u>	<u>Конечная концентрация 1x</u>	<u>Количество 8 мкл</u>
5x буфер первой нити			
H ₂ O категории ПЦР	---	---	6 мкл

Затем смесь нагревали при 42°C в течение 2 минут после чего добавляли фермент

<u>Компонент</u>	<u>Концентрация стока</u>	<u>Конечная концентрация</u>	<u>Количество</u>
------------------	---------------------------	------------------------------	-------------------

SuperScript™ II RT 200 Ед/мкл

5 Ед/мкл

2 мкл

Смесь (40 мкл) затем инкубировали при 42 °С в течение 50 минут и затем реакционную смесь инактивировали при 70 °С в течение 15 минут.

27. β 1-интегрин mAb: выделение переменных доменов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Для выделения переменных доменов антител (VL и VH) проводили ПЦР с праймерами, описанными в Wang et al. (2000) с изменениями (таблица 2).

Таблица 2. Праймеры, используемые для выделения переменных доменов VL и VH, из Wang et al., (2000) с модификациями

Каппа цепь	легкая цепь	Название учебника	Последовательность
Прямой праймер		degKappadir	GAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (SEQ ID No: 31)
Обратный праймер		Kapparev	GGATACAGTTGGTGCAGCATC (SEQ ID No: 32)
Тяжелая цепь		Название	Последовательность
Прямой		degH1dir	CAGGTTACTCTGAAAGWGTSTG (SEQ ID No: 33)
Прямой		degH2dir	GAGGTCCARCTGCAACARTC (SEQ ID No: 34)
Прямой		degH3dir	CAGGTCCAAACTUCAGCARCC (SEQ ID No: 35)
Прямой		degH4dir	GAGGTGAASSTGGTGGGAATC (SEQ ID No: 36)
Прямой		degH5dir	GATGTGAACTTGGAAGTGTC (SEQ ID No: 37)
Обратный праймер		IgG1rev	GGAAGATCTATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC (SEQ ID No: 38)

Существует два класса легких цепей: каппа и лямбда; но поскольку 95% антител мыши имеют легкую цепь каппа (Honjo and Alt, 1995), были выбраны праймеры, специфичные для легкой цепи каппа, игнорирующие лямбда-тип. Прямые праймеры конструировали с использованием выравнивания белковой последовательности Framework1 (FRW1) каждой переменной области цепи. Обратные праймеры конструировали в константной области (CH1) рядом с концом переменного домена каждой цепи (легкая цепь каппа или тяжелая цепь IgG1). Для легкой цепи каппа использовали только одну пару праймеров, тогда как для тяжелой цепи были

использованы 5 пар праймеров, составленных из IgG1rev в комбинации с 5 прямыми праймерами.

Для выделения VH как TS2/16, так и BV7 была выбрана пара праймеров IgG1rev-degH4dir.

Чтобы предотвратить мутацию, вызванную ДНК-полимеразой, были использованы ДНК-полимераза высокой точности с корректирующей активностью: ДНК-полимераза KOD Hot Start (Novagen) с использованием следующего протокола:

<u>Компонент 10x буфера</u>	<u>Запас концентрации 10x</u>	<u>Конечная концентрация 1x</u>	<u>Сумма 5 мкл</u>
MgSO 4	25 мм	1,5 мм	3 мкл
dNTP	2 mM каждый	0,2 mM каждый	5 мкл
Прямой праймер	10 мкМ	0,3 мкл	1,5 мкл
Обратный праймер	10 мкМ	0,3 мкл	1,5 мкл
ДНК	---	---	10 нг
ДНК-полимераза для горячего старта KOD 1 Ед/мкл	0.02 Ед/мкл	1 мкл	
H2O категории ПЦР---	---	до 50 мкл	

Смесь инкубировали в ПЦР-амплификаторе по следующему протоколу:

<u>Стадия 1</u>	<u>Температура 95 °C</u>	<u>Время 2 мин</u>
2	95°C	20 сек
3	54 °C (VH) или 46 °C (VL)	10 сек
4	70°C	10 сек
5	70°C	5 минут

Стадии 2-4 повторяли 30 раз.

28. *β 1-интегрин тАб: клонирование переменных доменов без применения рестриктаз*

Для последовательности VH и VL переменные домены клонировали без

применения рестрикционных ферментов в векторе, подходящем для секвенирования ДНК. Мы использовали наборы TA-Cloning Kit или Zero-Blunt Cloning Kit (Invitrogen), следуя инструкциям производителя.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК И ОЧИСТКА ИЗ АГАРОЗОВОГО ГЕЛЯ

ДНК-электрофорез использует электрическое поле для перемещения отрицательно заряженной ДНК к положительному электроду через матрицу из агарозного геля. Продукты ПЦР и расщепленную рестриктазой ДНК обрабатывали на агарозном геле (1,5% агарозы в буфере TAE (трис, уксусная кислота, EDTA)), окрашенном бромидом этидия, вместе с маркером 2log DNA ladder (NEB) для разделения фрагментов разного размера. Электрофорез проводился при 100 В. Таким образом, представляющая интерес полоса была удалена из геля чистым скальпелем и очищена с использованием набора для очистки ПЦР QIAquick (QIAGEN), следуя инструкциям производителя. Очищенную ДНК элюировали с помощью 30 мкл H₂O для ПЦР.

Сплайсинг с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами (SOE-PCR)

ScFv-конструкцию собирали путем сплайсинга с помощью ПЦР с удлинением внахлест (SOE-PCR) в порядке VL-линкер-VH, используя праймеры, описанные в (Wang et al 2000) с модификациями (таблица 3). Полипептидный линкер, соединяющий переменные домены, конструировали в виде четырех GGGGS-повторов.

Таблица 3 Праймер предназначен для сборки конструкции VL-линкер-VH с помощью SOE-PCR (VLREVSOFI и VHFORSOFI) и клонирования последовательности в вектор pHenIX (VLFORSFI и VHREVNOT) или в вектор scFv-hERG-pHenIX (VLFORSXHO и VHREVPALI). Курсивом обозначены участки праймеров, отжигающиеся на матрице, последовательности, добавленные для клонирования конструкции в рамке с экспрессирующей кассетой в pHenIX или в векторе scFv-hERG1-pHenIX выделены серым цветом, подчеркнуты сайты рестрикции, серое - последовательности, добавленные для облегчения гидролиза ферментами, и полужирный шрифт представляет последовательности, которые перекрываются в SOE-PCR.

Название	Последовательность
VLFORSFI	
VLREVSOFI	GGAGCCGCGCCGCGCCAGAACCAACCACCACCAGAA CCACCACCACCGGATACAGTTGGTGCAGCATC
VHFORSOFI	GGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGAG GTGAAGGTGGTGAATC (SEQ ID No: 41)

VHREVNOT
VLFORXHO
VHREVPALI

Протокол состоит из двух стадий, описанных на Фигуре 10. Первая стадия позволяет добавить: на 3'-конце VL последовательность, которая кодирует первые три GGGGS-повторов линкера, а на 5'-конце VH последовательности, которая кодирует последние два GGGGS-повтора линкера. На этой стадии также будут присоединены на 5'-конце VL и на 3'-конце VH сайты рестрикции, которые будут использоваться для клонирования конструкции VL-линкер-VH в экспрессирующем векторе. Вторая стадия позволяет объединить два продукта ПЦР благодаря перекрывающимся последовательностям (15 п.н.) на 3'-конце VL и на 5'-конце VH.

На первой стадии были проведены две параллельные ПЦР: одна с парой праймеров VLFORSFI-VLREVSOF и матрицей pCRII-VL; и другая с парой праймеров VHFORSOE-VHREVNOT и матрицей pCRII-VH. Протокол ПЦР с использованием ДНК-полимеразы KOD проводили, как описано ранее.

На второй стадии мы рассчитали SOE-PCR, используя в качестве матрицы 1 мкл каждой реакции ПЦР, проведенной на первой стадии, и пару праймеров VLFORSFI-

Компонент 10х буфера	Стоковая концентрация 10х	Конечная концентрация 1х	Сумма 5 мкл
MgSO 4	25 мм	1,5 мм	3 мкл
dNTP	2 мМ каждый	0,2 мМ каждый	5 мкл
праймер VLFORSFI	10 мкМ	0,3 мкл	1,5 мкл
праймер VHREVNOT	10 мкМ	0,3 мкл	1,5 мкл
ПЦР ВЛ (ШАГ 1)	---	---	1 мкл
ПЦР VH (СТАДИЯ 1)	---	---	1 мкл
ДНК-полимераза для горячего старта KOD 1 Ед/мкл		0,02 Ед/мкл	1 мкл
H2O категории ПЦР---		---	до 50 мкл

VHREVNOT, следуя протоколу ниже:

Смесь (50 мкл) инкубировали в ПЦР-амплификаторе в соответствии с протоколом ниже:

<u>Стадия 1</u>	<u>Температура 95 °C</u>	<u>Время 2 мин</u>
2	95°C	20 сек
3	70°C	10 сек
4	70°C	10 сек
5	70°C	5 минут

Стадии 2-4 повторяли 30 раз

29. *Получение и характеристика антитела против hERG1-β1 с одной цепью (scDb) - scDb-hERG1-β1*

Конструкцию hERG1-β1-scDb трансформировали в штамм GS115 *Pichia pastoris* в соответствии с ранее описанной методикой сферопластирования, и белок экспрессировали и очищали с использованием протокола экспрессии и очистки, ранее описанного для антител scFv-hERG1 и scFv-hERG1-Cys.

КЛЕТОЧНЫЙ ELISA

Клеточный ELISA на живых клетках проводили согласно Sette et al., (2013). Клетки НЕК 293 WT (hERG1-/β1+) и НЕК 293-hERG1 (hERG1+/β1+) высевали до полуконфлюентности в 96-луночном планшете в DMEM плюс 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и инкубировали в течение ночи при 37 °C и 5% CO₂. После трех промывок PBS анти-hERG1-β1-scDb разводили в различных концентрациях в культуральной среде и добавляли к клеткам в течение двух 2 часов при комнатной температуре. Следующие стадии были такими же, как описано выше.

ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯ (IF)

IF проводили в соответствии с протоколом, который был описан ранее. Покровные стекла покрывали BSA и фибронектином в течение двух часов. IF выполняли на клетках НЕК 293 WT (hERG1-/β1+), НЕК 293-hERG1 (hERG1+/β1+) и GD25 WT (hERG1-/β1-).

30. *Получение и предварительная характеристика анти-hERG1-β1 одноцепочечного диатела (scDb) - scDb-hERG1-Cys-β1- антитела*

МУТАГЕНЕЗ scDb-hERG1-β1

Мутагенез проводили на экспрессирующей кассете scDb-hERG1-β1, клонированной в pPIC9K, с использованием набора для направленного мутагенеза QuikChange® XL (Stratagene, Agilent Technologies). Подходящие праймеры для введения

аминокислоты Cys были сконструированы в соответствии с указаниями производителя и разработаны Primm Biotech, левый праймер: GGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAACAGGTTGGGGACCTG (SEQ ID No: 21); правый праймер: CAGGTCCCCAACCTGTTGCACAGTAATAGACTGCAGAATCC (SEQ ID No: 22)).

Образец реакции готовили следующим образом: 5 мкл 10X реакционного буфера; 1 мкл матрицы дцДНК scFv-hERG1 (13 нг/мкл); 1,84 мкл (125 нг) левого праймера; 1,84 мкл (125 нг) правого праймера; 1 мкл смеси dNTP; 3 мкл QuickSolution; 36, 32 мкл ddH₂O. Затем добавляли 1 мкл ДНК-полимеразы PfuTurbo (2,5 Ед/мкл). Условия проведения циклов были скорректированы: начальное плавление проводили при 95 °C в течение 1 минуты, затем следовали 18 циклов трехступенчатой программы (95 °C, 50 секунд; 60 °C, 50 секунд и 68 °C, 4 минуты). Реакционную смесь затем выдерживали при 68 °C в течение 7 минут и охлаждали до 4 °C.

После реакции амплификации 1 мкл рестриктазы DnpI (10 Ед/мкл) добавляли непосредственно к реакционной смеси, которую инкубировали сразу после этого при 37 °C в течение 1 ч для гидролиза родительского раствора. В этот момент бактериальные ультра компетентные клетки DH5 α трансформировали с помощью теплового шока. Клетки осторожно размораживали на льду и 2 мкл ДНК, обработанной DpI, переносили в отдельную аликвоту 200 мкл ультракомпетентных клеток. Реакционную смесь инкубировали на льду в течение 30 минут. Затем пробирку подвергали тепловому импульсу при 42 °C в сухой бане в течение 45 с. Пробирку инкубировали на льду в течение 2 мин. Клетки извлекали с помощью 450 мкл среды SOC (среда SOB с добавлением 1 mM MgSO₄, 1 mM MgCl₂) и инкубировали 1 час при 37 °C при встряхивании. Бактерии высевали в предварительно нагретые чашки с LB-агаром, содержащие антибиотик ампициллин (50 мкг/мл), и инкубировали крышкой вниз в течение ночи при 37 °C.

На следующий день выросло несколько колоний, и некоторые из них были отобраны, а ДНК была извлечена и секвенирована для проверки наличия желаемой мутации. Полученную конструкцию назвали scDb-hERG1-Cys- β 1.

ЭКСПРЕССИЯ И ОЧИСТКА АНТИТЕЛА scDb-hERG1-Cys- β 1.

scDb-hERG1-Cys- β 1 трансформировали в дрожжевом штамме GS115 *Pichia Pastoris* в соответствии с ранее описанной методикой сферопластирования, а белок экспрессировали и очищали с использованием протокола экспрессии и очистки, ранее описанного для антител scFv-hERG1 и scFv-hERG1-Cys. с использованием АКТА Pure (Ge Healthcare). Хроматограммы анализировали с использованием программного обеспечения

Unicorn 7.0.

ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯ (IF)

IF проводили соответствии с протоколом, который был описан ранее. Покровные стекла покрывали BSA и фибронектином в течение двух часов. IF выполняли на клетках GT25 WT (hERG1-/β1-), HEK 293 WT (hERG1-/β1+), HEK 293-hERG1 (hERG1+/β1+) в соответствии с ранее описанным протоколом. IF выполняли с использованием scDb-hERG1-Cys-β1, конъюгированного с флуорофором Alexa488.

Анализ жизнеспособности

Клетки PANC-1 (аденокарцинома протоков поджелудочной железы) и клетки MDA-MB 231 (рак молочной железы) высевали при 5×10^5 в 96-луночные планшеты и давали расти в течение ночи. На следующий день клетки обрабатывали scDb-hERG1-Cys-β1 в разных разведениях (0, 10, 20, 40, 100 мкг/мл) и инкубировали с антителом в течение 24 часов. Каждое условие было выполнено в трех повторях.

После инкубации клетки отделяли и подсчитывали, для определения IC50 применяли программное обеспечение Origin.

3D-СФЕРОИДНАЯ КУЛЬТУРА

10^3 клетки PANC-1 и MDA-MB 231 высевали на агарозный базовый слой (1,5 г/л) в 96-луночный планшет и выращивали в течение 72 часов в увлажненном инкубаторе при 37 °C и 5% CO₂. Затем вводили scDb-hERG1-Cys-β1 (40 мкг/мл), разведенную в культуральной среде, в то время как свежую среду без антител добавляли в лунки, содержащие клетки, обработанные как отрицательные контроли. Фотографии получали через 24 часа для мониторинга роста клеток с помощью микроскопа Nikon, Eclipse TE300.

Анализ латеральной подвижности

Клетки высевали в чашки Петри диаметром 35 мм при начальной плотности 5×10^5 и оставляли на 24 часа.

Латеральная подвижность оценивалась с помощью однослойного раневого анализа (Silletti et al., 1995; Peck and Isacke, 1996). Ширина раны определялась сразу после этого (0 ч) путем измерения ширины раны в 45 фиксированных точках

Клеточную подвижность определяли количественно как «индекс подвижности» (MI), определяемый следующим образом:

$$MI = 1 - (W_t/W_0)$$

MI = 0 указывает на отсутствие движения клеток, тогда как значения MI=1 указывают на полное закрытие раны

Биораспределение антител scFv-hERG1-D8Cys и scDb-hERG1-Cys-β1.

160 мкг каждого антитела инъецировали двум мышам Balb/c, в.в. Образцы крови

отбирали у каждой мыши в разные моменты времени после в.в.: 5, 10, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 6 ч, 24 ч после инъекции. Образцы крови обрабатывали и выделяли плазму. ELISA-тест на образцах плазмы проводили в соответствии с протоколом, ранее описанным в этом разделе. $t_{1/2}$ рассчитывали с использованием программного обеспечения Precise PK Pharmacokinetic.

ЭКГ-ИЗМЕРЕНИЯ.

Измерения ЭКГ выполняли до введения антител и непрерывно после в.в. инъекции антитела в течение 15 мин.

ЭКСПЕРИМЕНТЫ IN VIVO

Анализ in vivo

Мечение scFv-hERG1-D8Cys с помощью Alexa 750: 150 мкг scFv-hERG1-D8Cys в концентрации 2 мг/мл в растворе PBS и 0,1 М буфера бикарбоната натрия, pH 8,3, инкубировали в течение 1 часа при 22 °C при перемешивании с 12 мкл сложного эфира Alexa Fluor® 750 NHS (сукцинимидиловый эфир) (Thermo Fisher Scientific), ресуспендировали в DMSO в концентрации 10 мг/мл. Реакцию блокировали в течение 5 минут на льду, и меченый белок очищали с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке с сефадексом G25 (Sigma), уравновешенной PBS.

Визуализация in vivo. Трех шести недельным иммунодефицитным бестимусным самкам Nude-Foxn1 nu/nu вводили внутривенно 50 мкл (1 нм краситель/мышь) scFv-hERG1-D8Cys, меченных флуорофором Alexa 750, и измеряли флуоресценцию через 5, 10, 60 мин и 24 ч после введения антитела. Одну контрольную мышь обрабатывали стерильным раствором PBS. Все спектры флуоресцентной эмиссии были измерены с использованием фотонного томографа (Biospace Lab). В тепловизоре был лазерный источник для возбуждения флуоресценции (= 679 нм), эмиссионный фильтр (= 702 нм) для обнаружения флуоресценции и компьютер для анализа данных.

Мышиная модель: клеточную линию MIAPaCa-2 использовали для имплантации опухолевых клеток, как описано в Lastraioli et al., 2015. Клетки культивировали в DMEM с добавлением L-глутамина (4 mM), 10% эмбриональной бычьей сыворотки и генетицина (G418) (2,4 мг/мл) (Gibco) при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Клетки MIAPaCa-2-luc инъецировали в поджелудочную железу мышей nu/nu, и животных контролировали (как описано в [17]), и через 45 дней после клеточного инокулята мышам вводили антитело scFv-hERG1-D8Cys-Alexa750.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое антитело (Ab), содержащее переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) из анти-hERG1 антитела, которые связывают внеклеточный домен S5-P hERG1 и переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) из анти- β 1-интегрин антитела, которые связывают внеклеточный домен β 1-интегрина, где переменный домен тяжелой цепи (VH) анти-hERG1 антитела имеет 85% идентичности с SEQ ID No: 8 или SEQ ID No: 2; переменный домен легкой цепи (VL) анти-hERG1 антитела имеет 85% идентичности с SEQ ID No: 4; переменный домен (VH) тяжелой цепи анти- β 1-интегрин антитела имеет, по меньшей мере, 85% идентичности с SEQ ID N: 26 или SEQ ID N: 46, а переменный домен легкой цепи (VL) анти- β 1-интегрин антитела имеет минимум 85% идентичности с SEQ ID N: 24 или SEQ ID N: 48.

2. Биспецифическое антитело по п. 1 имеет формат, выбранный из группы, состоящей из тандемных scFv, формата диатела, одноцепочечных диател, тандемных диател (TandAb) и переориентирующихся молекул с двойной аффинностью (DART).

3. Биспецифическое антитело по п. 2, включающее первый переменный домен (VH) тяжелой цепи, имеющий, по меньшей мере, 85% идентичности с SEQ ID NO: 8, где остаток в положении 95 представляет собой Cys, и первый домен VL, имеющий, по меньшей мере, 85% идентичности с SEQ ID NO: 4 и второй домен VH, имеющий, по меньшей мере, 85% идентичности с SEQ ID NO: 26 или SEQ ID N: 46, и второй домен VL, имеющий, по меньшей мере, 85% идентичности с SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 48.

4. Биспецифическое антитело по п. 3, где домены собраны в следующем порядке: домен VH анти-hERG1-Cys, связанный первым линкером с доменом VL анти- β 1-интегрин, связанным вторым линкером с доменом VH анти- β 1-интегрин, связанным третьим линкером с доменом VL анти-hERG1-Cys.

5. Молекула анти-hERG1, содержащая переменный домен (VH) тяжелой цепи, имеющий, по меньшей мере, 85% идентичности с SEQ ID NO: 8, где остаток в положении 95 представляет собой Cys, и переменный домен легкой цепи (VL), имеющий, по меньшей мере, 85% идентичности с SEQ ID NO: 4, где указанная молекула обладает специфичностью в отношении внеклеточной части S5-поры hERG1.

6. Молекула анти-hERG1 по п. 5, которая представляет собой полностью гуманизированным рекомбинантным антителом, scFv, Fab, Fv-форму простой цепи scFv, диател, триател, биспецифических молекул, минител или фаговых антител.

7. Молекула анти-hERG1 по п. 6, в которой VH и VL связаны пептидным линкером.

8. Биспецифичное антитело по п. 4 или молекула против hERG1 по п. 7, где линкерами являются мотивы (Gly4Ser)₃.

9. Молекула анти-hERG1 по любому из пп. 5-8, имеющая SEQ ID No: 10.

10. Молекула против hERG1 по любому из пп. 5-9, которая помечена флуорофором или радионуклидом.

11. Биспецифичное антитело по любому из пп. 1-4 и 8 или молекула по любому из пп. 5-10 для применения в качестве лекарственного средства или в качестве диагностического средства.

12. Биспецифичное антитело или молекула для применения по п. 11, которая предназначена для применения при лечении или диагностике всех тех патологий, которые характеризуются сверхэкспрессией или неправильной экспрессией белка hERG1, предпочтительно опухолей, неврологических заболеваний, эндокринных заболеваний и нейроэндокринных заболеваний.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифичное антитело по любому из пп. 1-4 и 8 или молекулу анти-hERG1 по любому из пп. 5-10 и, по меньшей мере, другой фармацевтически приемлемый ингредиент.

14. Последовательность нуклеотидов, кодирующих биспецифичное антитело по любому из пп. 1-4 и 8, или молекулу по любому из пп. 5-10.

15. Экспрессирующий вектор или плазида, содержащая последовательность нуклеотидов по п. 14.

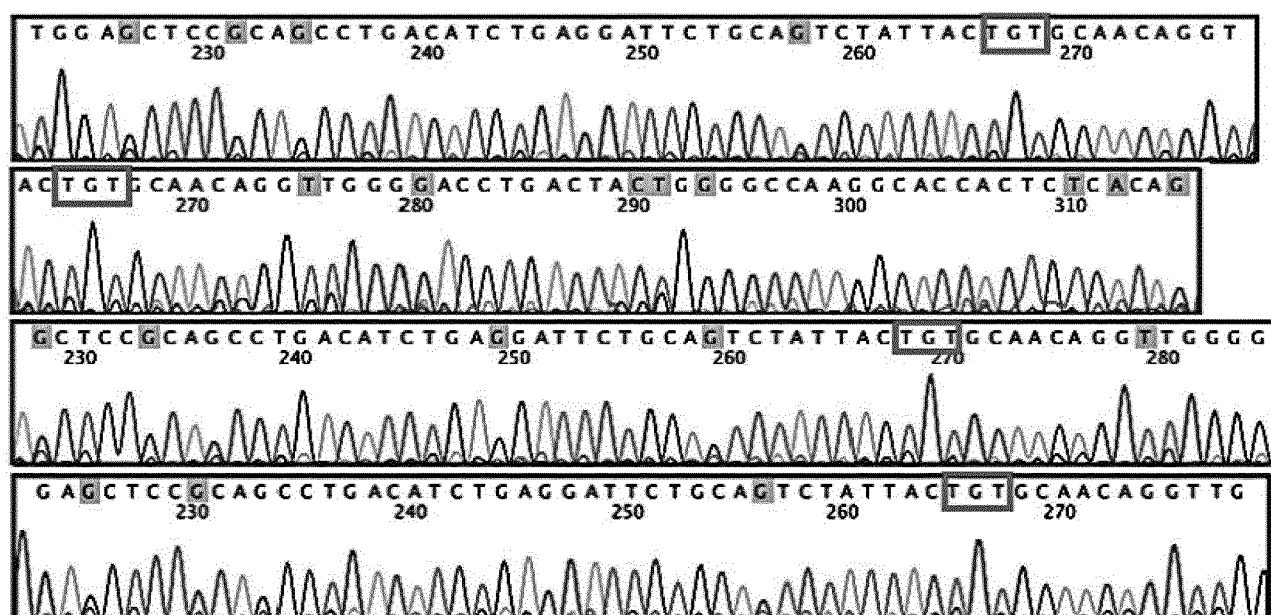
16. Генетически модифицированный микроорганизм или клетка, содержащая экспрессирующий вектор или плазмиду по п. 15.

17. Набор для диагностики *in vitro*, содержащий части для одновременного, раздельного или последовательного применения, причем указанный набор включает:

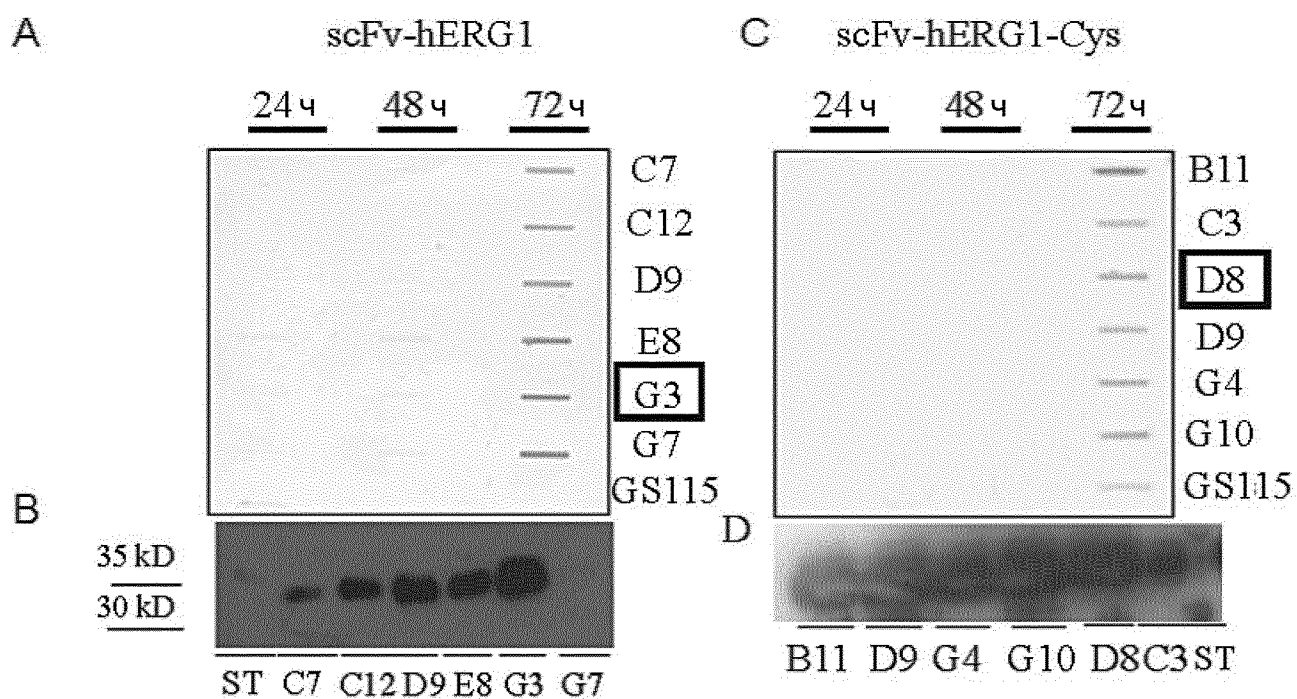
контейнер, содержащий анти-hERG1-Cys scFv по любому из пп. 5-10; и/или

контейнер, содержащий биспецифичное Ab по любому из пп. 1-4 и 8;

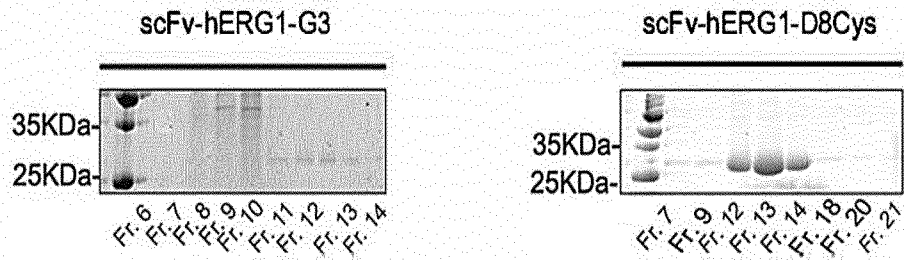
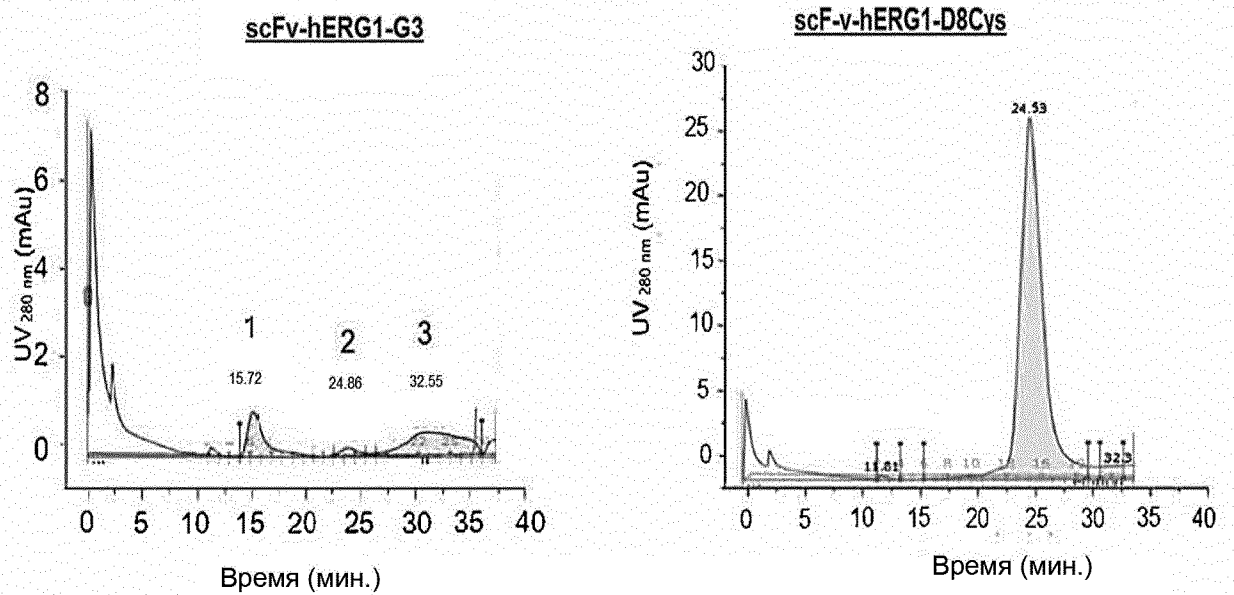
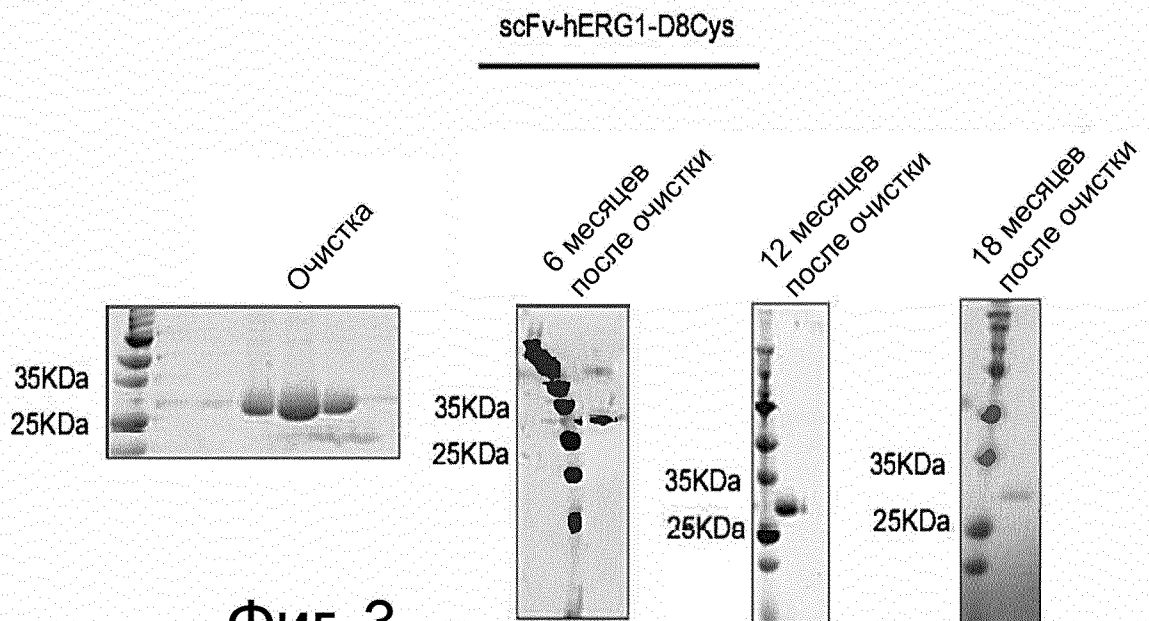
необязательно контейнер, содержащий интактное моноклональное анти-hERG1 антитело в качестве эталонного контроля.



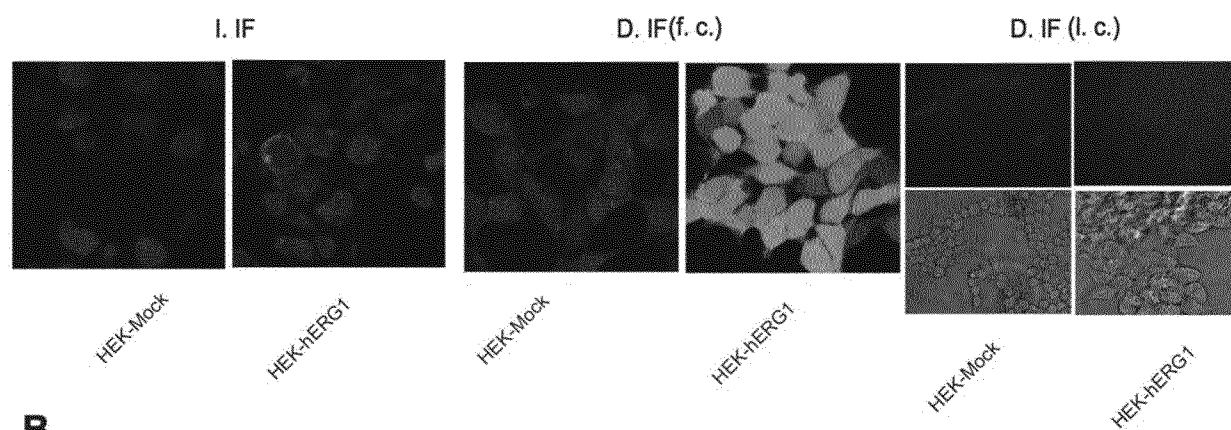
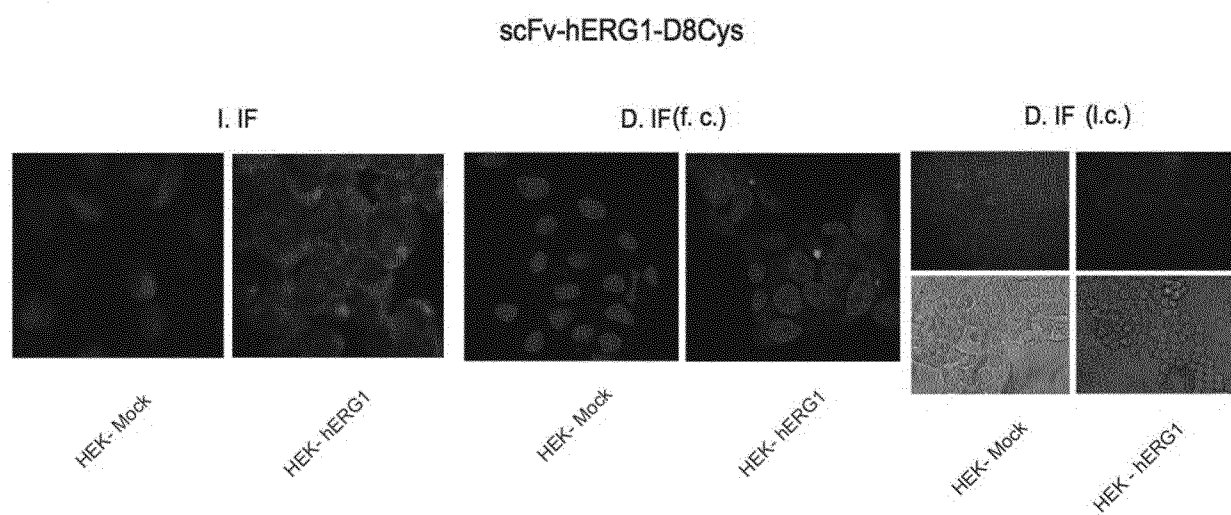
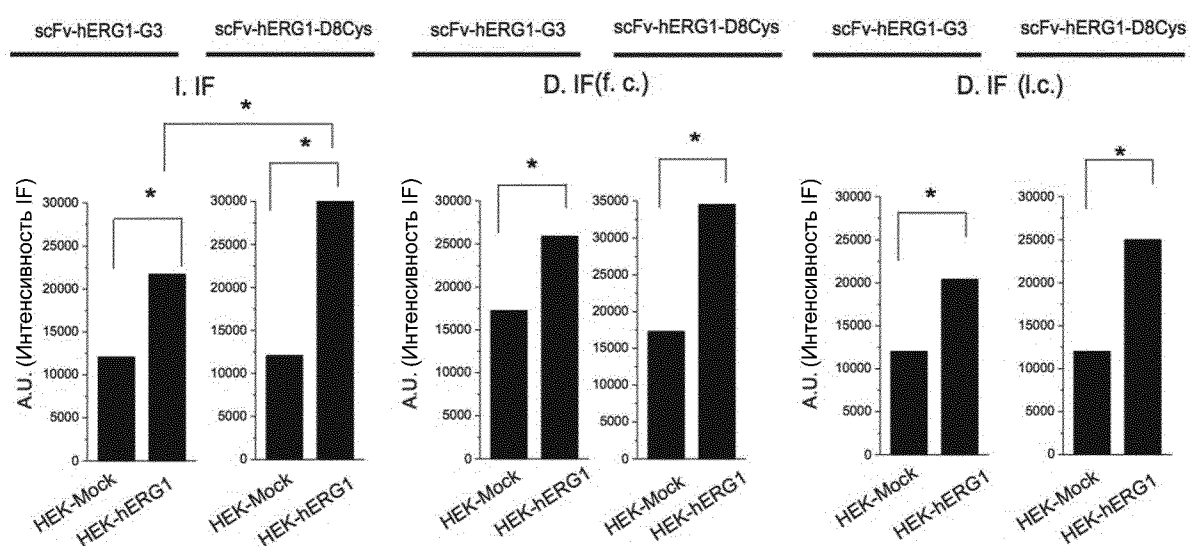
Фиг. 1



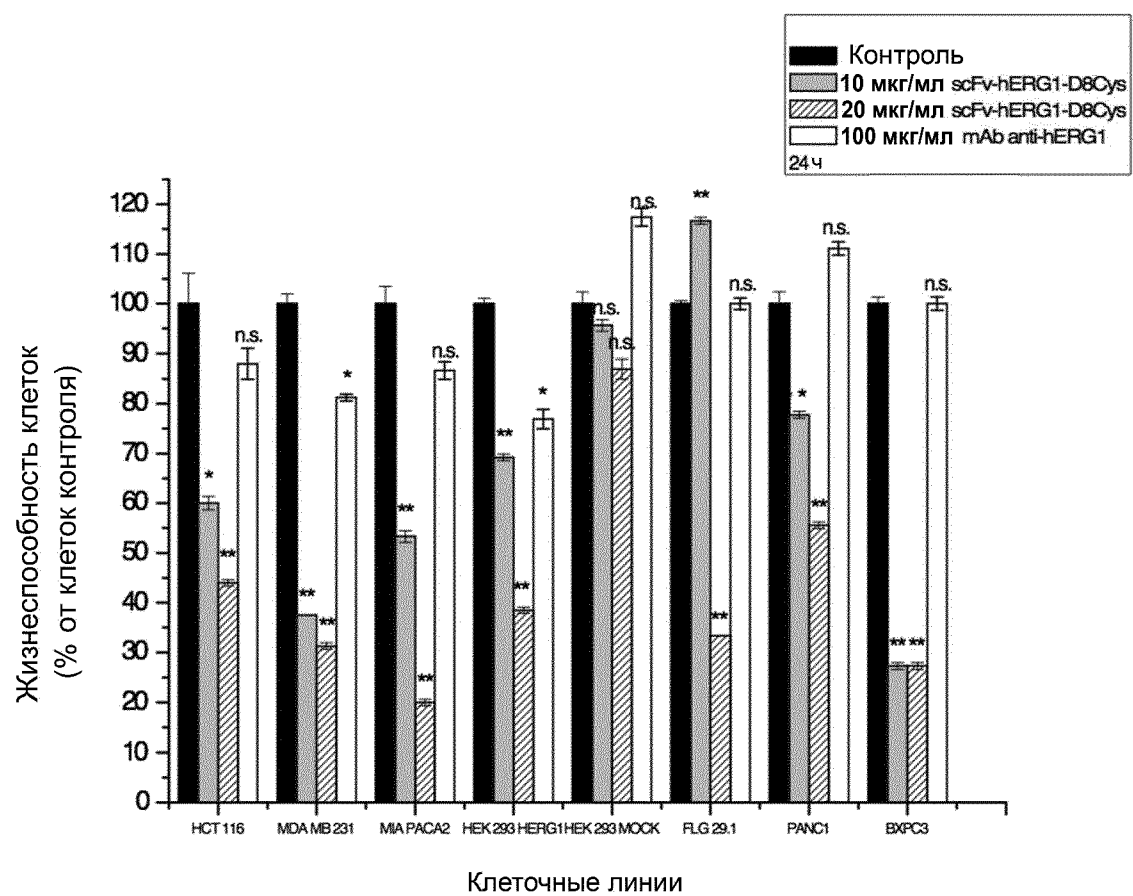
Фиг. 2

A**B****C**

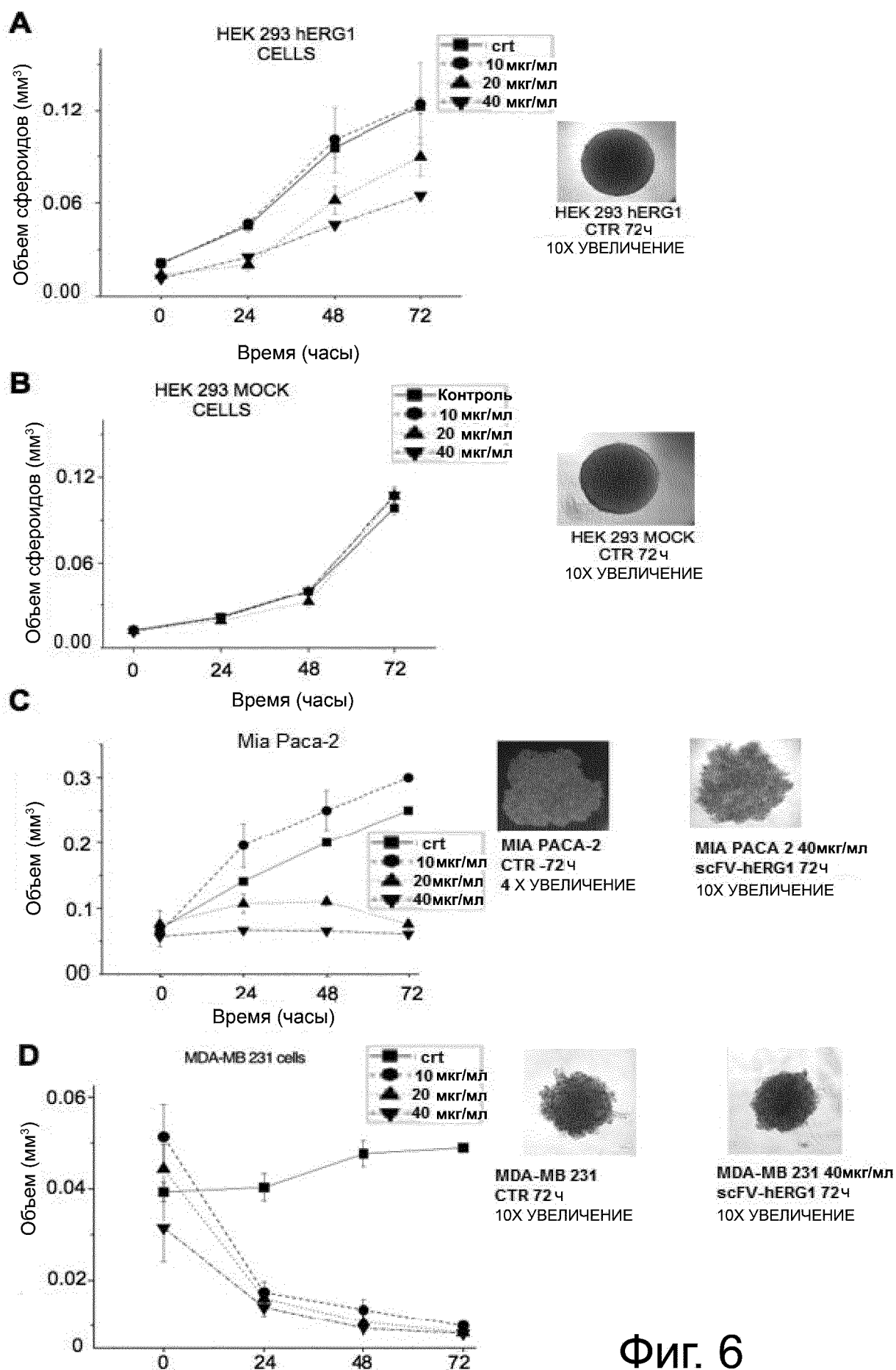
Фиг. 3

A**B****C**

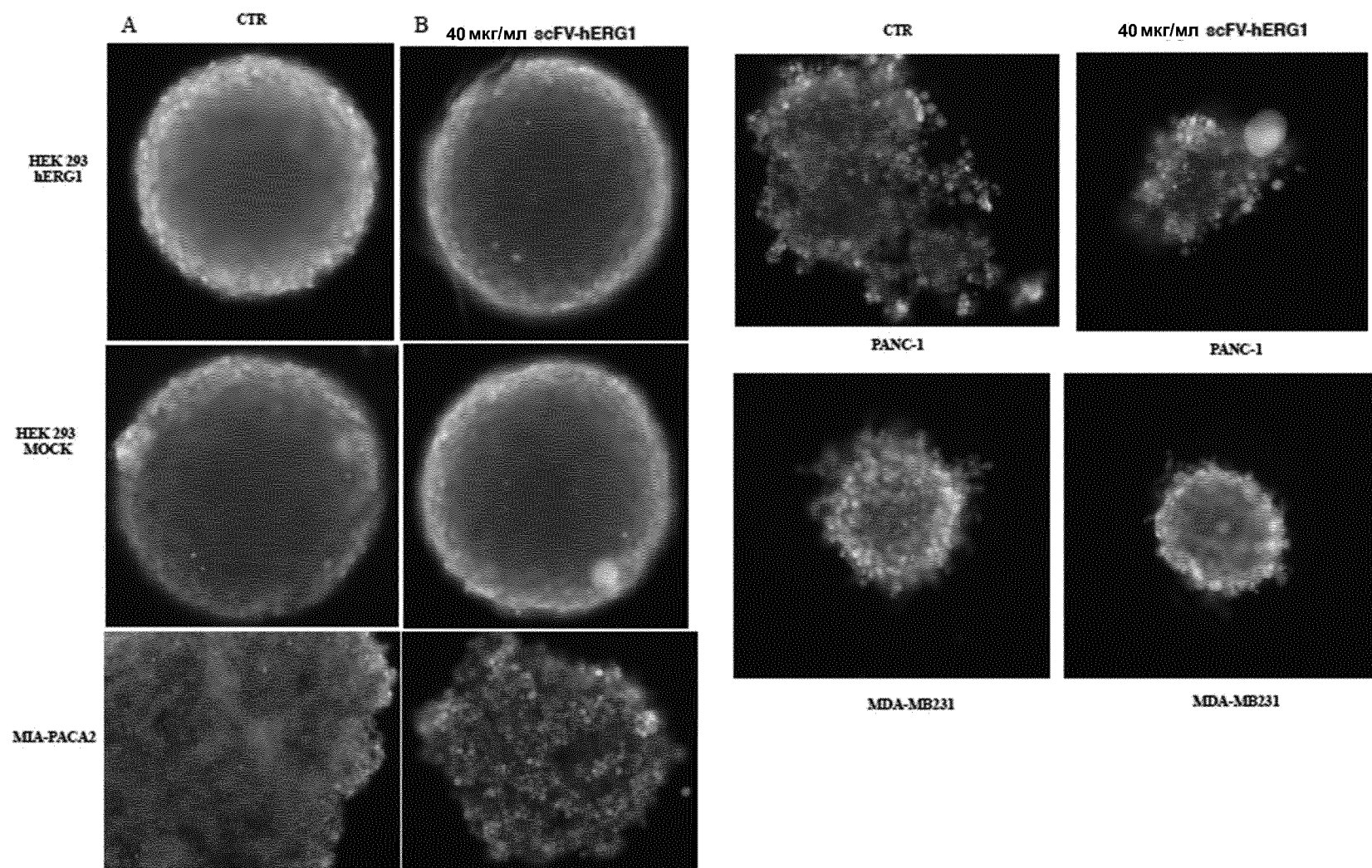
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

TS2/16

Нуклеотидная последовательность домена VL (SEQ ID No: 23)

GATATTGTGATGACACAGACTCCAACCACCATGGCTGCATCTCCCGGGGACAAGATCACTATC
ACCTGCAGTGTCAAGTTCAATTATAAGTTCCAATTACCTGCATTGGTATAGTCAGAAGCCAGGAT
TCTCCCCTAAACTCTTGATTTATAGGACATCCAATCTGGCTTCTGGAGTCCCACCTCGCTTCAGT
GGCAGTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTCACAATTGGCACCATGGAGGGCTGAAGATGTTGCC
ACTTACTACTGCCAGCAGGGTTCTGATATTCCACTCACGTTCCGGTGATGGGACCAAGCTGGAC
CTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC

Нуклеотидная последовательность домена VH (SEQ ID No: 25)

GAGGTGAAGGTGGTGGAACTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCACTAGCTATACCATGTCTTGGGTTCCGCCAGACTCCGGAG
AAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATAAGTAGTGGTGGTTCTTACACCTACTATCCAGACAGT
GTGAAGGGCCGATTCACCATTTCCAGAGACAAAGCCAAGAACACCCTGTATTTGCAAATGGG
CAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTACAAGAATAGGTTACGACGAAGATTA
TGCTATGGACCACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCC
CATCTGTCTAT

Фиг. 8А

Последовательности V_H и V_L антитела BV7

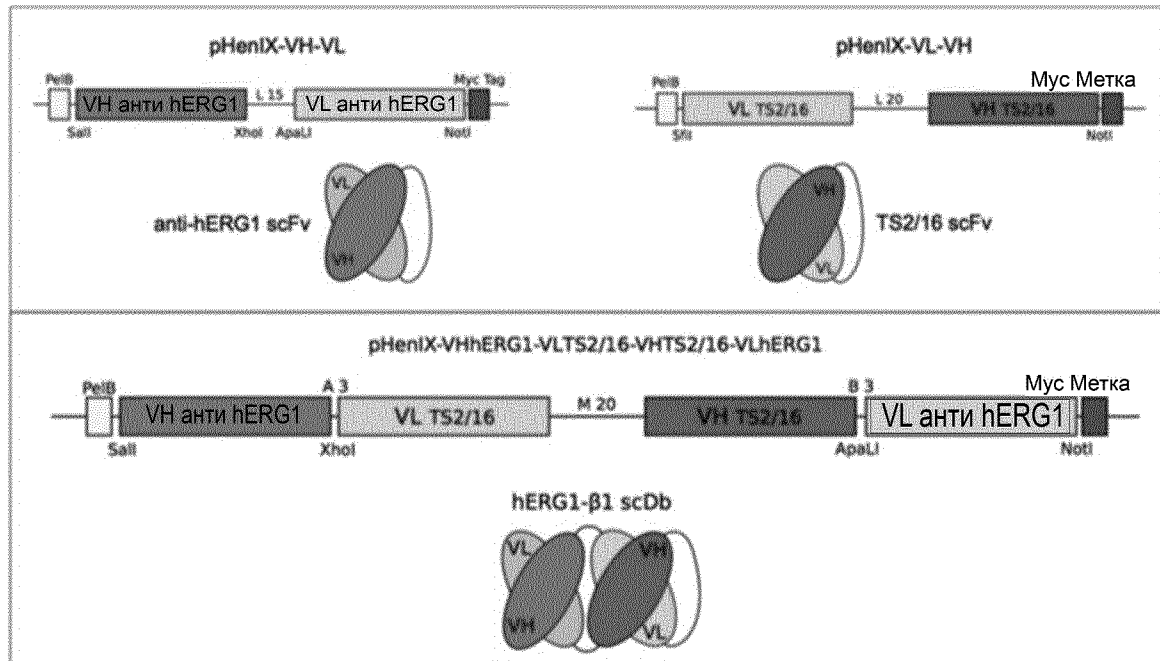
**Нуклеотидная последовательность домена V_H
(SEQ ID No: 45) антитела BV7**

**GAGGTGAAGCTGGTGGAAATCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGAGTCCCTGAAACTCTCCTG
TGAATCCAATGAATACGAATTCCTTCCCATGATTTGTCTTGGGTCCGCAAGACTCCGGAGAAGA
GGCTGGAGTTGGTCGCAGCCATTAATAGTGATGGTGGTAGCACCTACTATCCAGACACCATGGAG
AGACGATTCATCATCTCCAGAGACAATACCAAGAAGACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAG
GTCTGAGGACACAGCCTTGTATTACTGTGCAAGNCGTCTATTCTAYGTACGACGGTTCTACTTTGA
CTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTAT**

**Нуклеотидная последовательность домена V_L
(SEQ ID No: 47) антитела BV7**

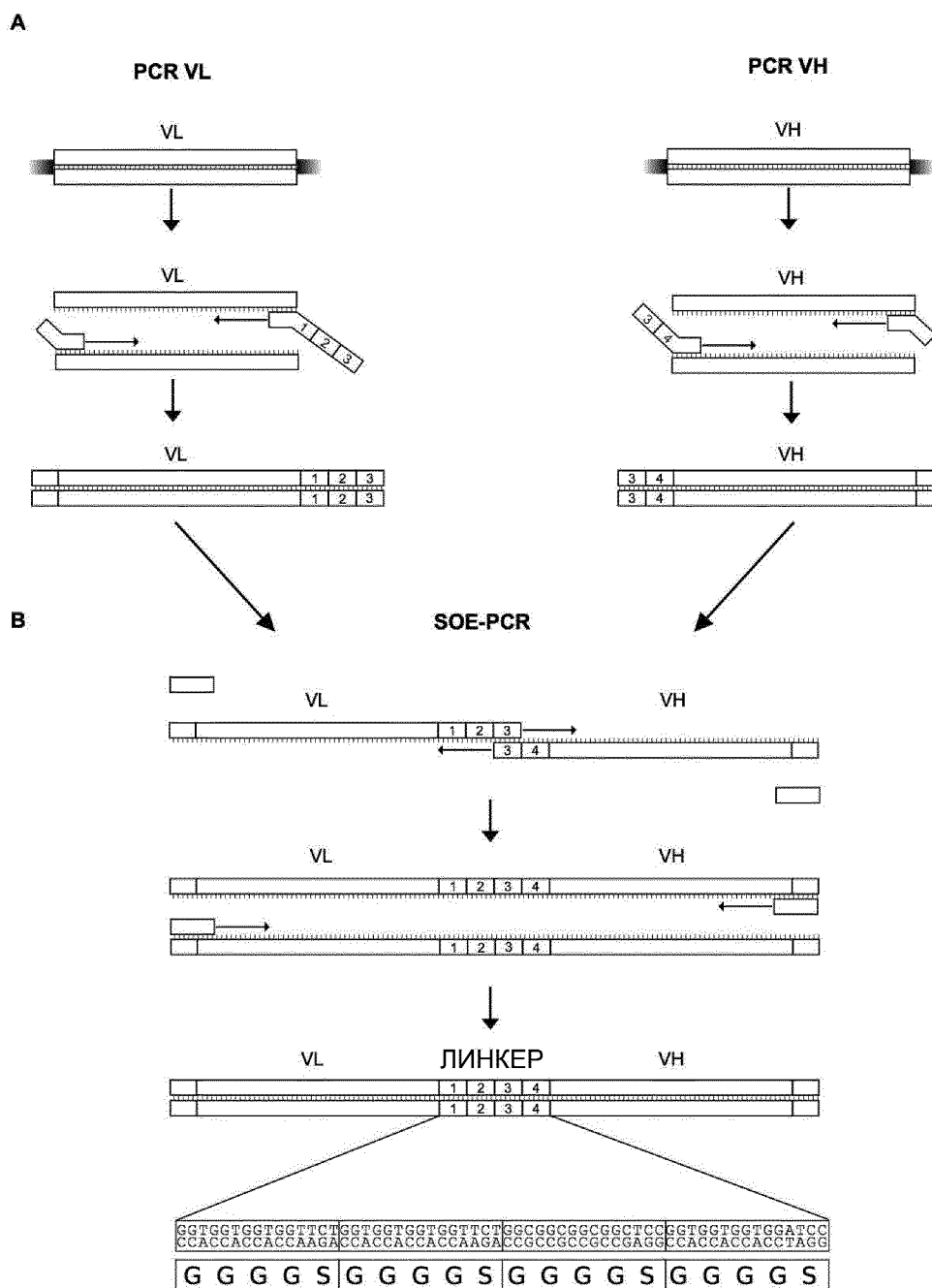
**GATATTGTGATCACCCAGTCTCCAATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAG
TTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGGAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGT
TTAAACTCCTCATCTACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGT
GGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTACCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTT
TTGCCAACAGGGTAATACTCTTCCATGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGGAATCAAGCGGG
CTGATGCTGCACCAACTGTATCC**

Фиг. 8B

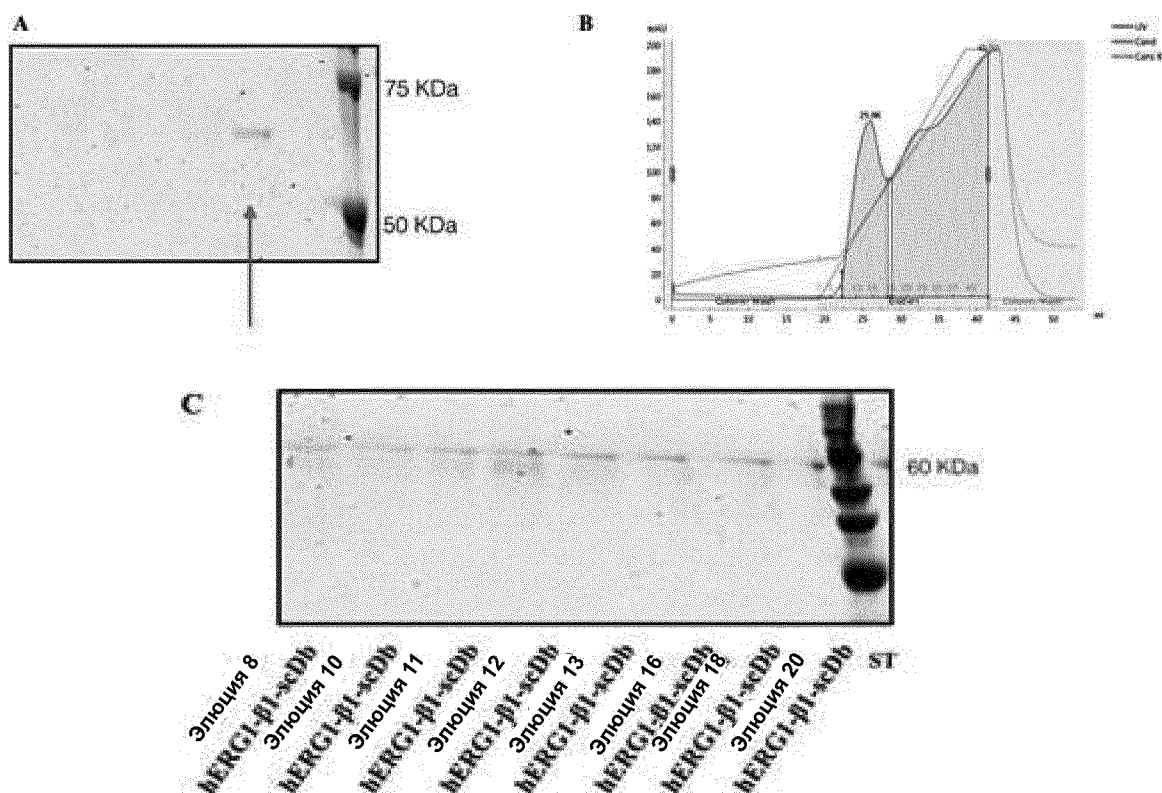


Фиг. 9

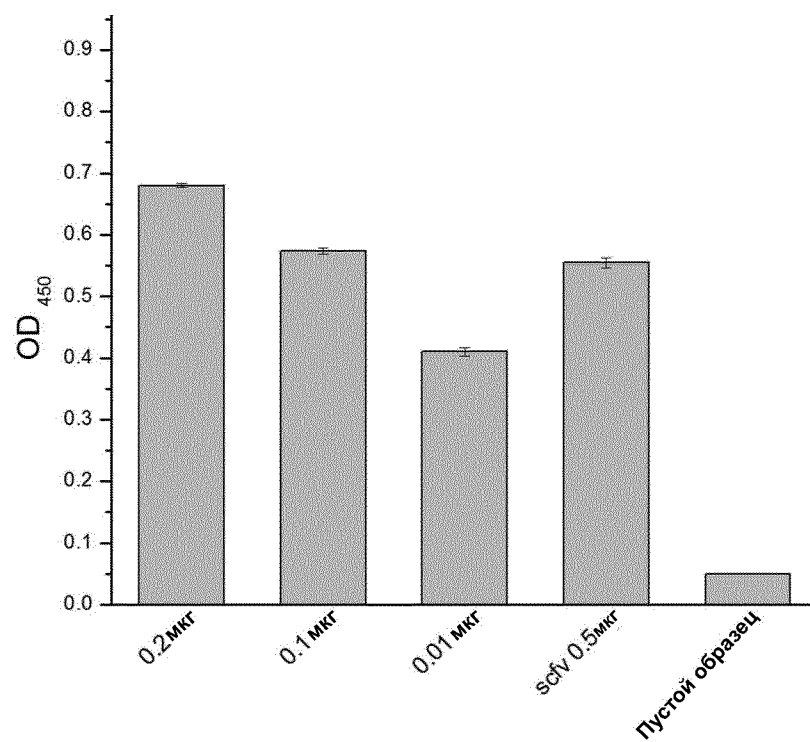
Сплайсинг с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами



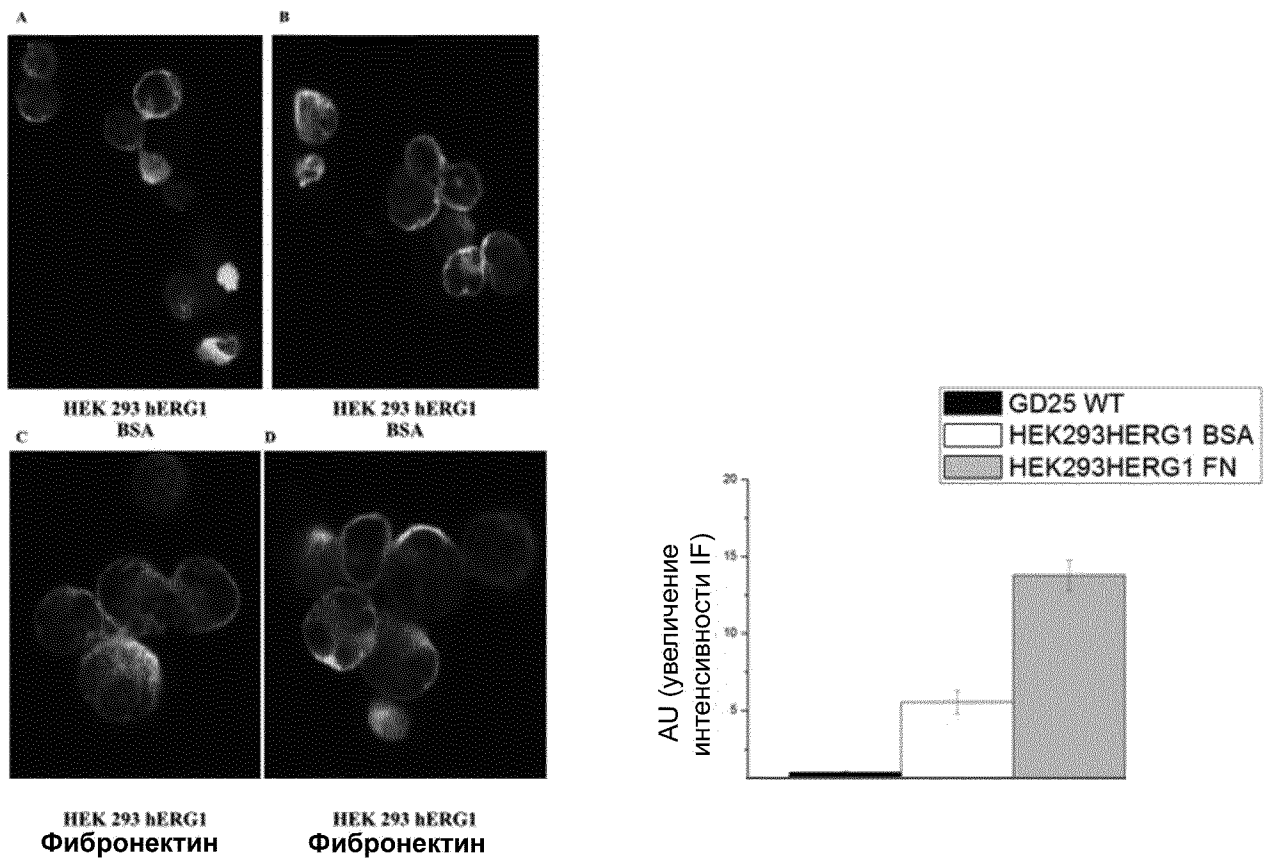
Фиг. 10



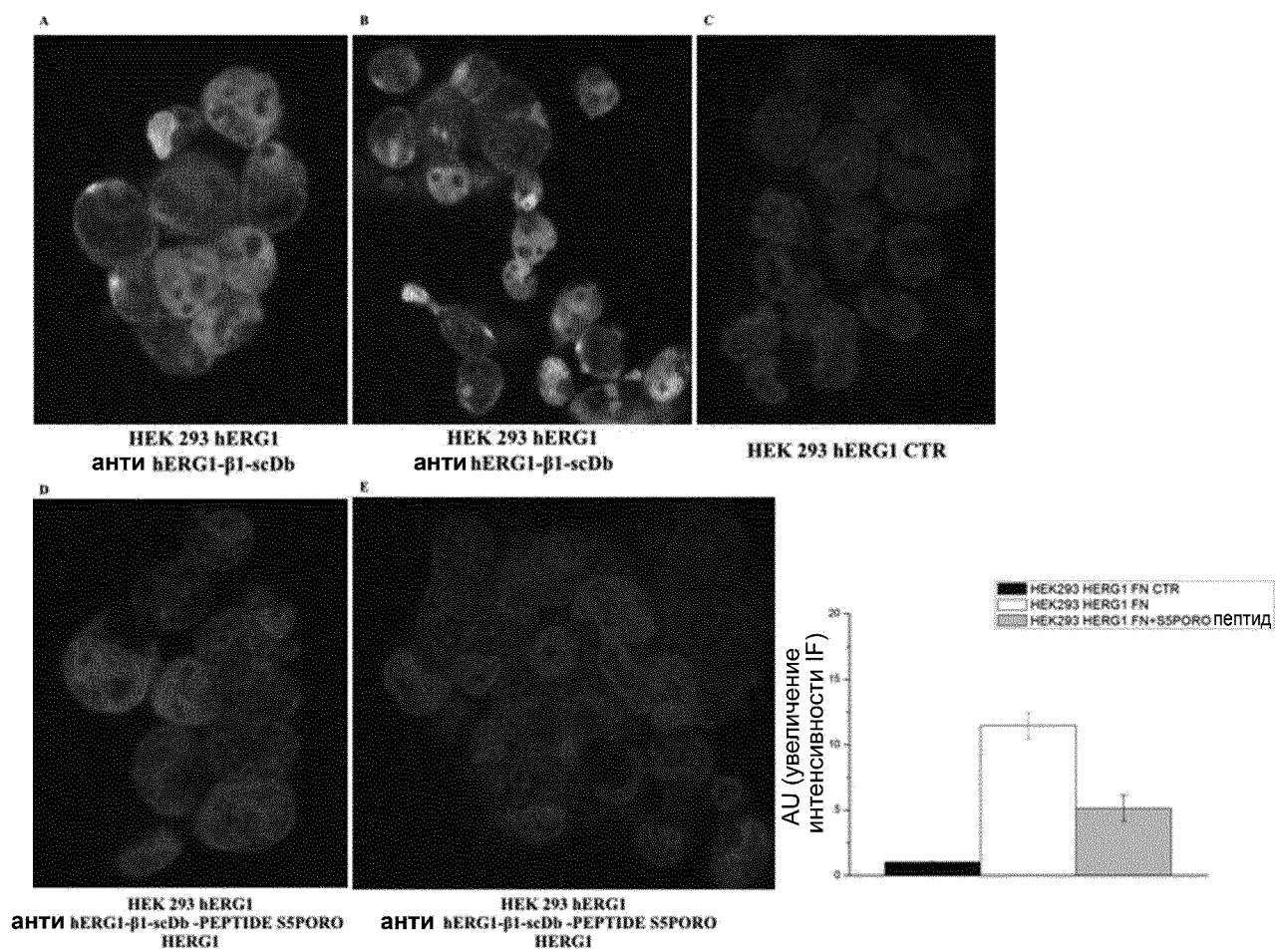
Фиг. 11



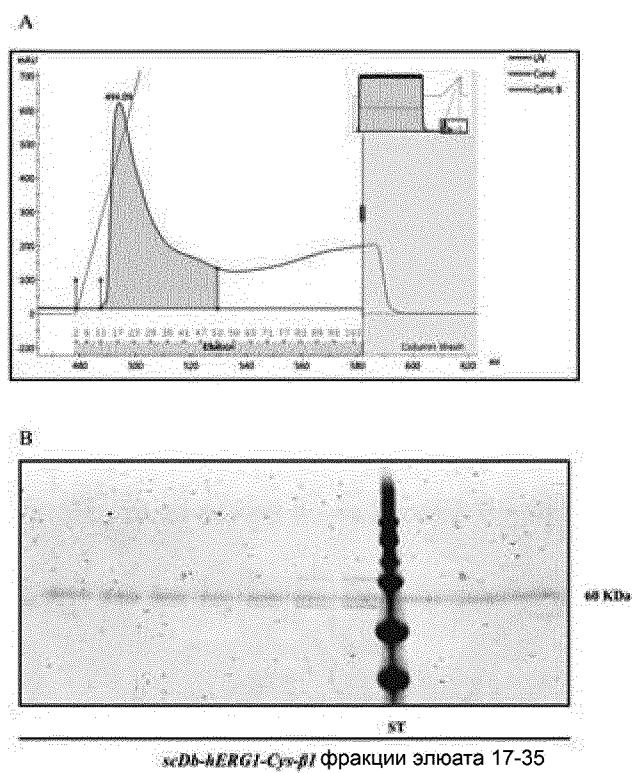
Фиг. 12



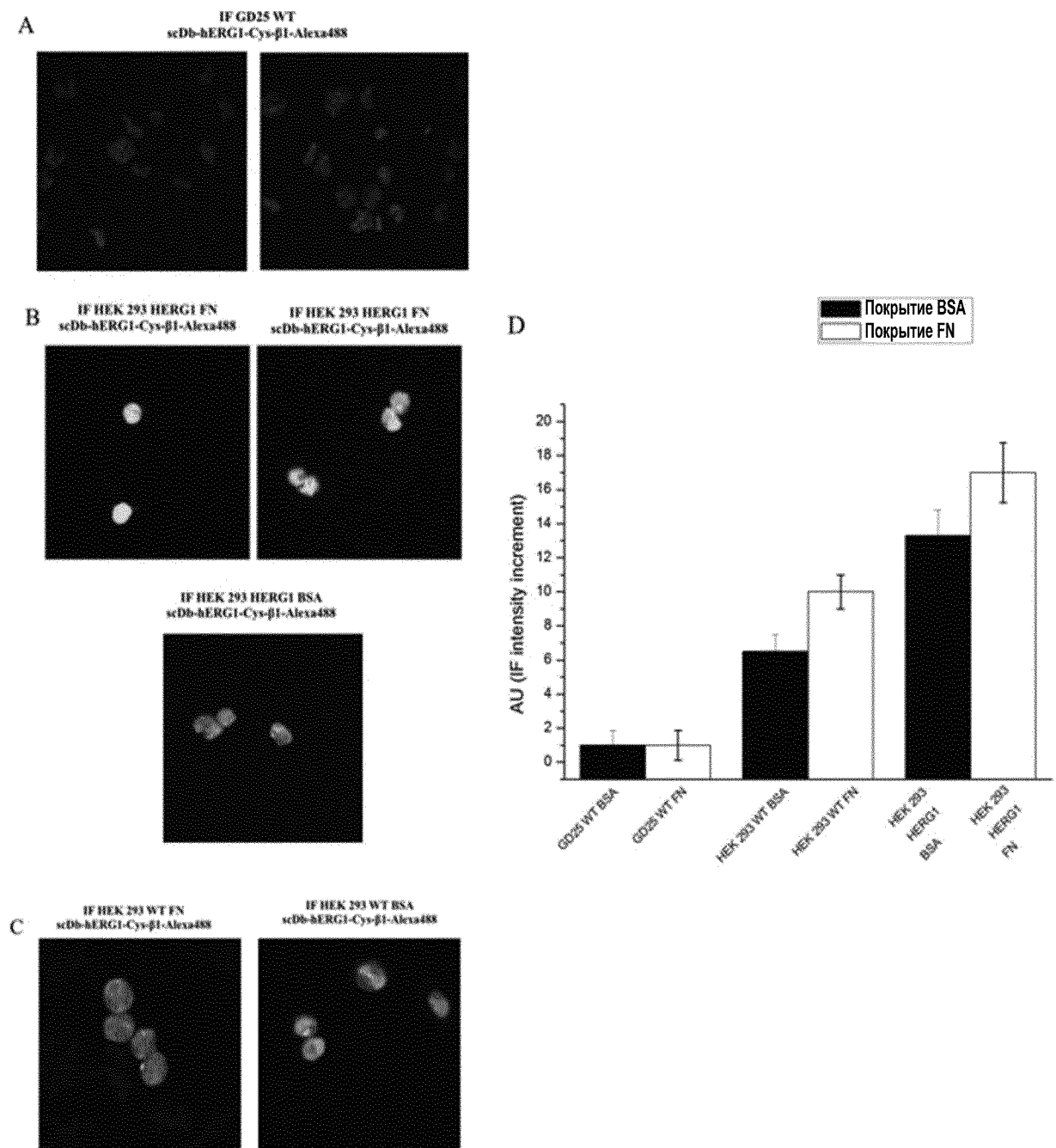
Фиг. 13



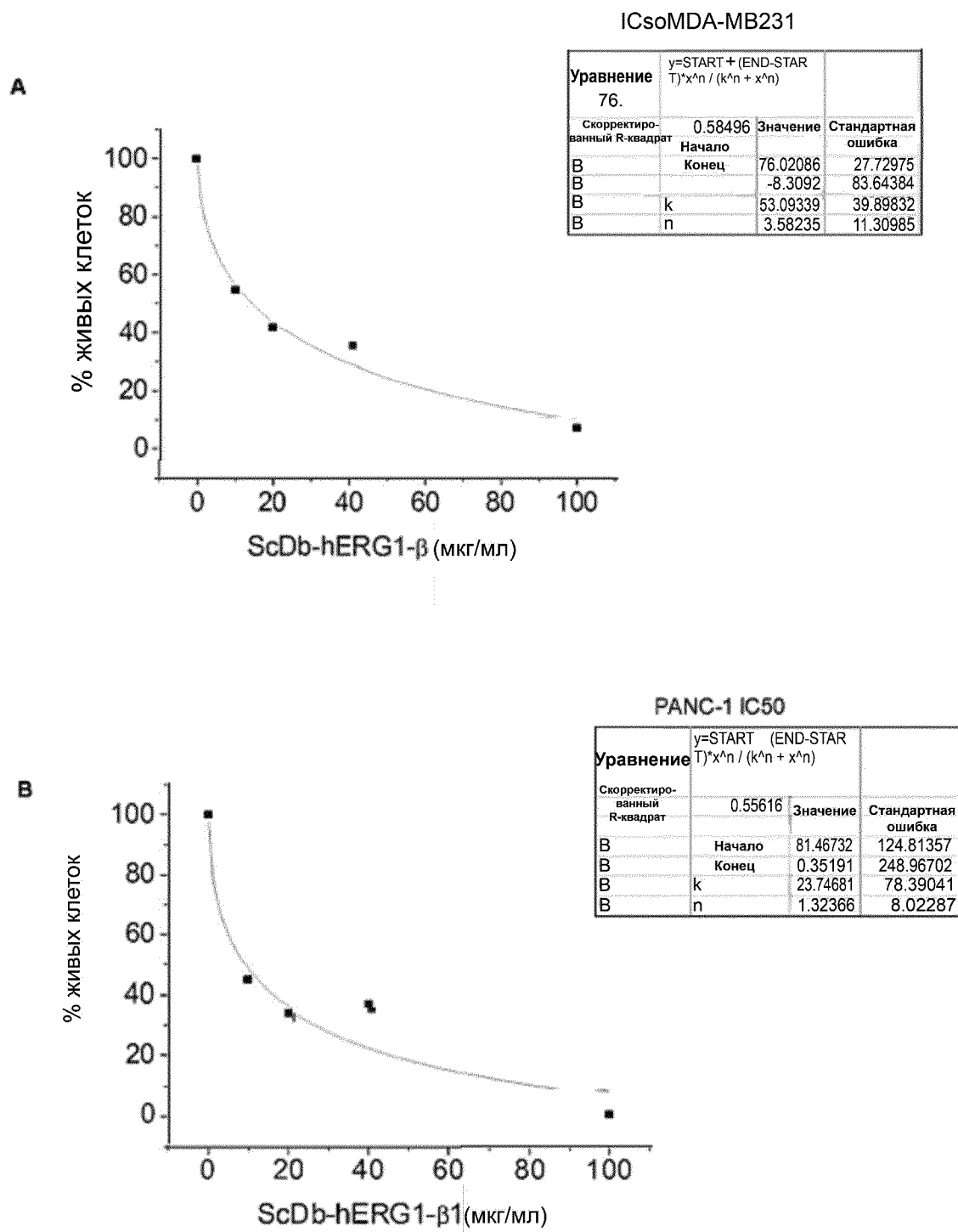
Фиг. 14



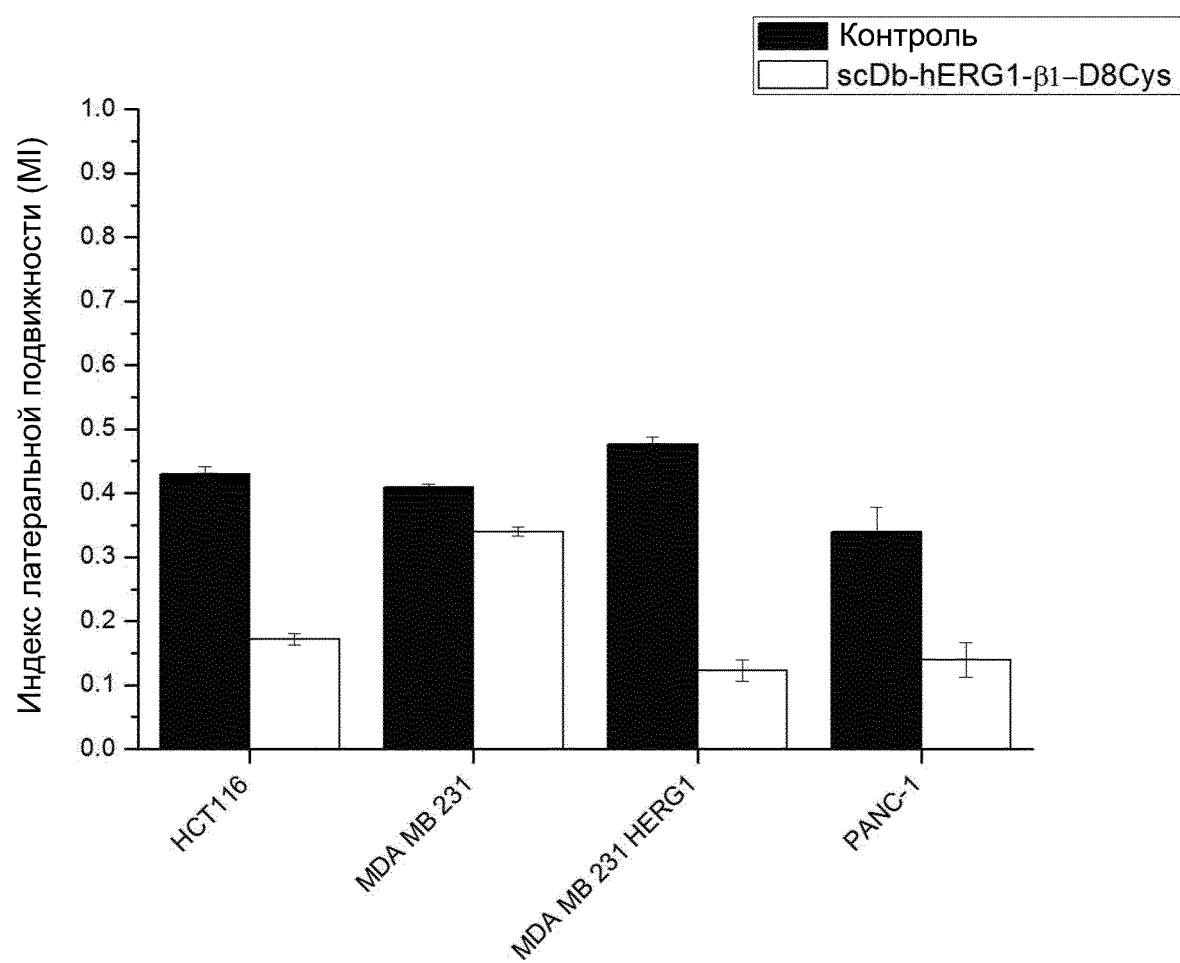
Фиг. 15



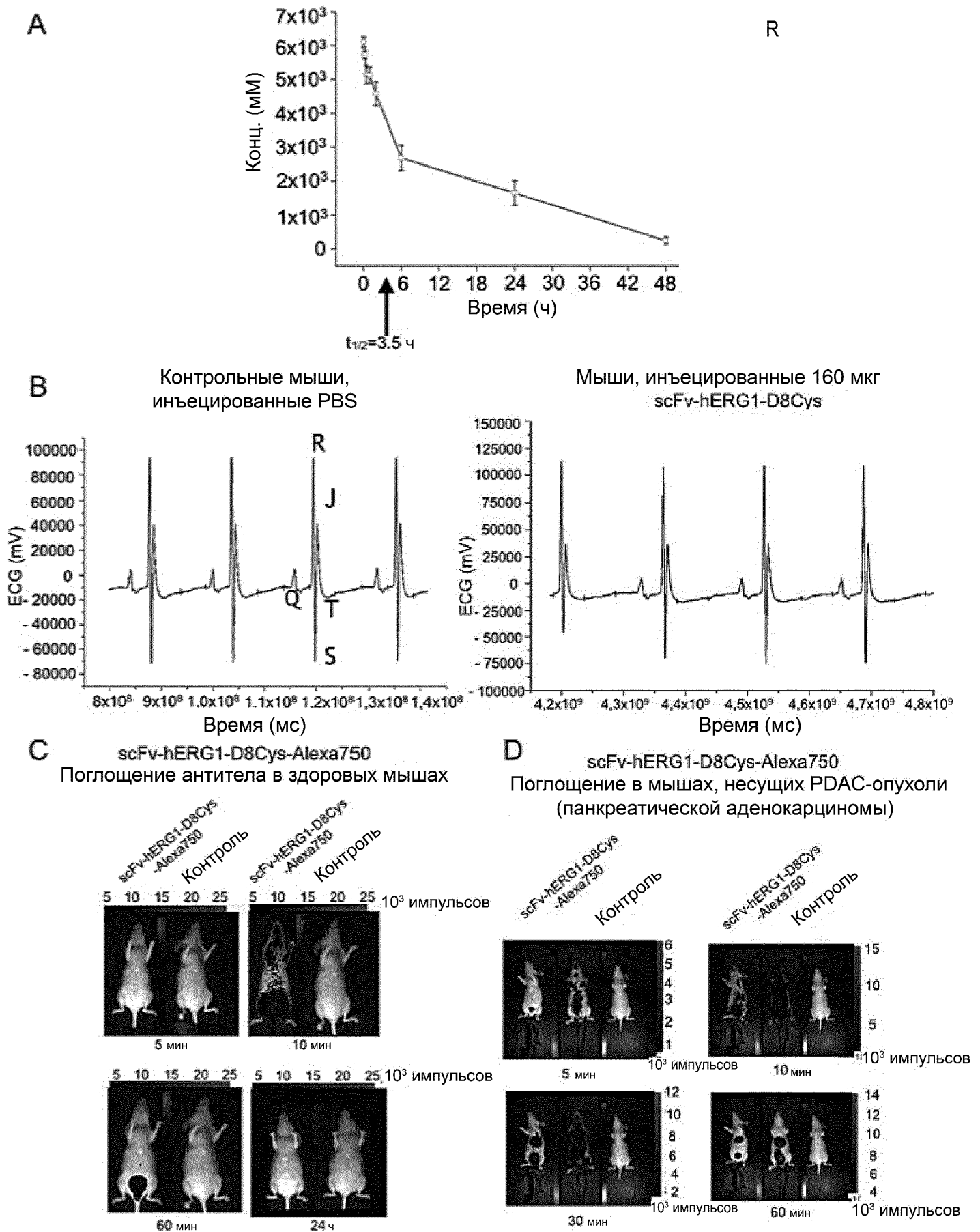
Фиг. 16



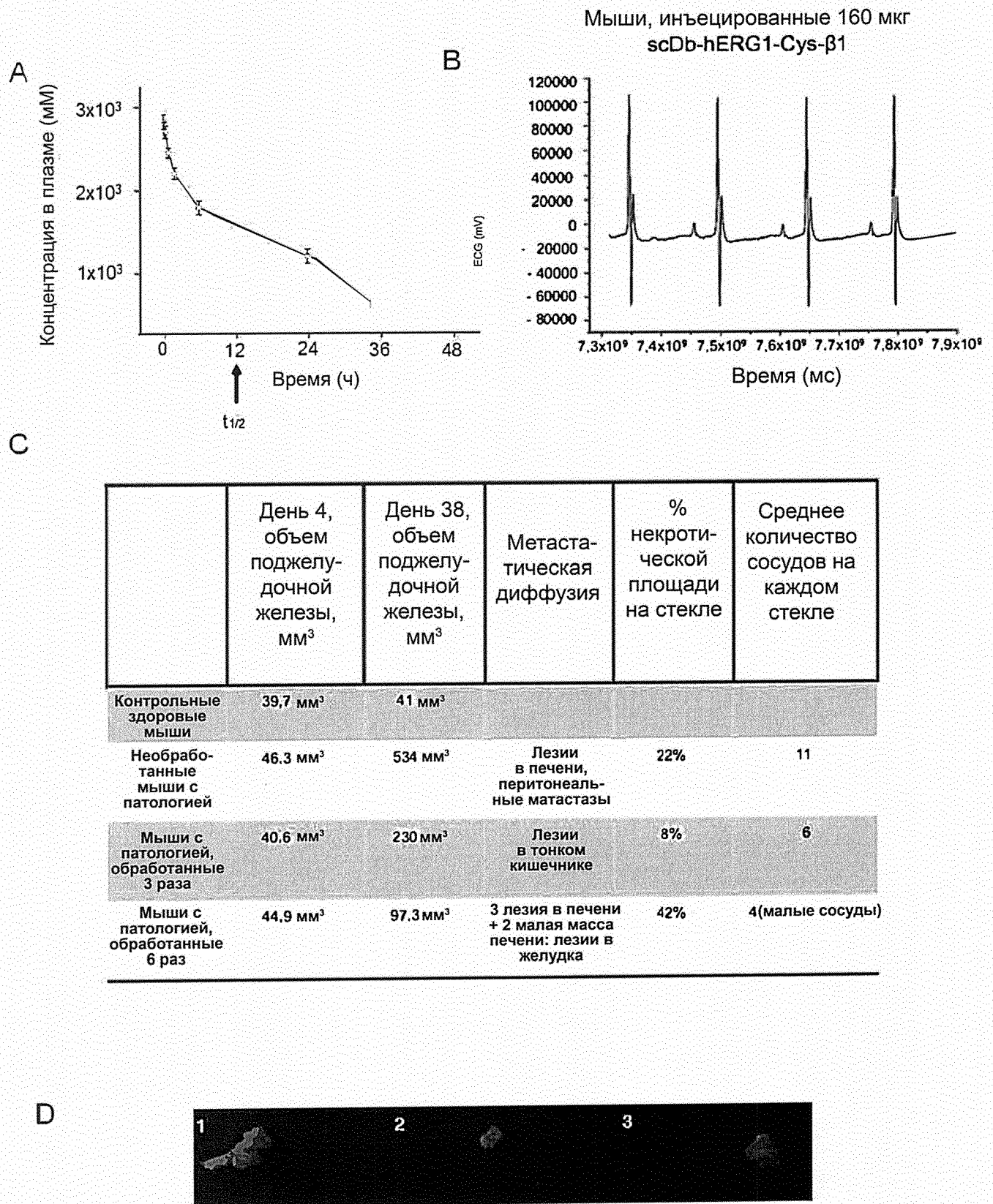
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20