

## ПАНЕЛЬ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ЭНДОГЛИНА ЧЕЛОВЕКА: ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА

© И. В. Смирнов,<sup>1, 2</sup> И. В. Грязева,<sup>1</sup> М. П. Самойлович,<sup>1, 3</sup> Л. А. Терёхина,<sup>1</sup>  
 А. А. Пиневич,<sup>1, 3</sup> А. А. Крылова,<sup>1</sup> И. Ю. Крутецкая,<sup>1</sup>  
 Н. Н. Никольский,<sup>2</sup> В. Б. Климович<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Российский научный центр радиологии и хирургических технологий,  
 Санкт-Петербург, 197758,

<sup>2</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,  
 и <sup>3</sup>С.-Петербургский государственный университет, 199034;  
 \* электронный адрес: vklimovich@gmail.com

Эндоглин (CD105) — маркер эндотелиальных и мезенхимных стромальных клеток, который входит в состав рецепторных комплексов, связывающих ростовые факторы TGF-β, BMP-9 и BMP-10. Его экспрессия значительно возрастает в сосудах ишемизированных тканей и растущих опухолей. Определение концентрации растворимой формы эндоглина в сыворотке и моче используется как один из методов диагностики онкологических заболеваний и патологии беременности. Цель работы состояла в создании нового семейства гибридом-продуцентов моноклональных антител (МКАТ) для выявления эндоглина на клеточных мембранах и в биологических жидкостях. В качестве иммуногена использовали синтезированный в клетках мышиной миеломы рекомбинантный внеклеточный участок молекулы эндоглина. Донорами иммунных спленоцитов служили мыши F1(SJL/J×BALB/c). Для скрининга гибридом и характеристики продуцируемых МКАТ использовали рекомбинантные аналоги антигена, синтезированные в клетках *Escherichia coli*, а также экспрессирующие CD105 перевиваемые клеточные линии и культуры МСК человека. Получено десять новых МКАТ, распознавающих не менее восьми отдельных эпипопов эндоглина. Восемь МКАТ взаимодействуют с мембранный формой эндоглина на поверхности нормальных и трансформированных клеток человека. Два МКАТ специфичны к линейным эпипопам полипептидной цепи и предназначены для выявления эндоглина методом иммуноферментного анализа (ИФА), выявляющая растворимый эндоглин в культуральных средах.

Ключевые слова: эндоглин, CD105, моноклональные антитела.

Принятые сокращения: АКО — аминокислотные остатки, ИФА — иммуноферментный анализ, МКАТ — моноклональные антитела, МСК — мезенхимные стромальные клетки, ОП — оптическая плотность, ФСР — фосфатно-солевой раствор, Eng — эндоглин, ТМВ — тетраметилбензидин, ZP — зона пеллюцида (zona pellucida).

Эндоглин (Eng) представляет собой трансмембранный белок I типа, экспрессируемый в эндотелиальных, гладкомышечных и мезенхимных стромальных клетках (МСК) и локализованный на их поверхности. Он является компонентом рецепторных комплексов, связывающих ростовые факторы TGF-β (Barbara et al., 1999), BMP-9 и BMP-10 (Castonguay et al., 2011; Nolan-Stevaux et al., 2012). Растворимая форма эндоглина образуется в результате протеолитического отщепления внеклеточного участка молекулы. Она присутствует в циркулирующей крови и выводится с мочой.

Интерес к получению моноклональных антител (МКАТ) к эндоглину обусловлен ролью, которую этот белок играет в поддержании гомеостаза сосудистого русла и в регуляции процессов ангиогенеза в нормальных и неопластических тканях, а также обширностью сферы возможного применения МКАТ в фундаментальных и прикладных исследованиях. CD105 используют в качестве

позитивного маркера в проточной цитометрии для идентификации МСК и клеток сосудистого эндотелия (Caplan, 2008; Banerjee et al., 2012). В иммуногистохимических исследованиях биопсийного материала выявление эндоглина позволяет различать сосудистые сети опухолей и нормальных тканей (Brewer et al., 2000; Seon et al., 2011). В настоящее время проводятся испытания меченых МКАТ к CD105 для визуализации сосудов опухолей *in vivo* (Lee et al., 2009; Shi et al., 2013). Определение концентрации растворимого эндоглина в сыворотке крови или моче с помощью иммуноферментных методов может иметь прогностическое значение при диагностике ряда онкологических заболеваний (Nassiri et al., 2011), а также при выявлении преэклампсии — патологического состояния беременных женщин (Gregory et al., 2014). В культурах клеток эндотелия с помощью МКАТ к эндоглину можно блокировать формирование капилляраподобных трубчатых структур (Nolan-Stevaux et al., 2012). Это свой-

ство антител рассматривают как предпосылку для их использования в антиangiогенной терапии новообразований (Tsujiie et al., 2008; Uneda et al., 2009). Цель настоящей работы состояла в создании нового семейства гибридом-продуцентов МКАТ, которые обеспечивали бы выявление мембранный формы эндоглина на клеточной поверхности и его растворимой формы в образцах биологических жидкостей.

Как следует из данных литературы, участки молекулы эндоглина, отвечающие за связывание лигандов и передачу angiогенных сигналов, при иммунизации мышей линии BALB/c вызывают слабый иммунный ответ (Nolan-Stevaux et al., 2012). Для повышения вероятности получения МКАТ против функционально значимых эпитопов эндоглина в качестве доноров иммунных спленоцитов в работе были использованы мыши F1(SJL/J×BALB/c), поскольку ранее было показано, что их иммунный ответ отличается от ответа мышей BALB/c спектром распознаваемых антителами эпитопов (Климонович и др., 1999).

## Материал и методика

**Антитела.** Для иммунизации мышей, выявления и изучения свойств МКАТ были использованы четыре рекомбинантных полипептида, воспроизводящие, полностью или частично, структуру внеклеточного участка эндоглина (рис. 1). 1. Eng-NS0 — коммерческий препарат, синтезированный в клетках мышной миеломы NS0 гликозилированный антиген, содержащий последовательность АКО 26—586. 2. Eng-N и Eng-C — созданные в лаборатории рекомбинантные полипептиды (60 кДа), синтезированные в клетках *E. coli* M15 [pREP4] и pET-21b(+), которые воспроизводят ту же аминокислотную последовательность и содержат гекса-гистидиновые группы на N- или C-конце цепи соответственно. 3. Eng-fr — созданный в лаборатории рекомбинантный полипептид, синтезированный в клетках *E. coli* M15 [pREP4], который соответствует центральному участку молекулы эндоглина в пределах АКО 34—487.

**Клеточные культуры.** Для выявления антител и изучения их эпитопной специфичности использовали первичные и перевиваемые клеточные культуры. Культуры МСК подкожной жировой ткани были получены в лаборатории (Пиневич и др., 2014) и использованы на 3—5-м пассажах. Перевиваемые линии карциномы печени HEP G2, эндотелия человека ECV304, глиобластом A172 и T98G были получены из коллекции НИИ гриппа РАМН, клетки эмбриональной почки человека HEK293 — из коллекции Института цитологии РАН. Линия EA.hy926, обладающая основными характеристиками клеток эндотелия человека, была предоставлена проф. И. С. Фрейдлин с любезного разрешения автора (Edgell et al., 1983). Культуры выращивали в средах α-MEM или DMEM-F12, содержащих от 5 до 10 % эмбриональной сыворотки телят. При культивировании клеток линии EA.hy926 в среду добавляли смесь, содержащую 100 мкМ гипоксантина, 0.5 мкМ аминоптерина и 16 мкМ тимицина. Посевные концентрации и сроки пересева были подобраны для каждой клеточной линии индивидуально. При пересевах для снятия клеток с культуральной поверхности использовали смесь трипсина и версена.

Для выявления CD105 на мембранных культурируемых клеток методом проточной цитометрии использова-

ли меченные фикоэритрином коммерческие антитела. Измерения проводили на цитофлуориметре BD FACSAria III.

**Иммунизация мышей, создание гибридом и получение МКАТ.** Для иммунизации и пассивирования клеток гибридом использовали мышей F1(SJL/J×BALB/c) в возрасте 2 мес, выращенных в виварии Российского научного центра радиологии и хирургических технологий. Иммуногенами служили рекомбинантные белки Eng-NS0 и Eng-fr. При первой иммунизации антигены эмульгировали в полном адьюванте Фрейнда и вводили мышам подкожно по 2—3 мкг. Спустя 1 мес антигены, эмульгированные в неполном адьюванте Фрейнда, вводили мышам внутрибрюшинно в дозе 1.5—3.0 мкг. Через 5—7 сут брали пробы крови для выявления циркулирующих антител. Мышам-донорам спленоцитов за 72 и 48 ч до постановки гибридизации вводили антигены, растворенные в фосфатно-солевом растворе (ФСР).

Слияние спленоцитов и клеток миеломной линии SP2/0 проводили по методу Гальфре (Galfre, Milstein, 1982). Затем клетки рассевали в 96-луночные планшеты, содержащие фидерный слой из перитонеальных макрофагов мышей. Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Для тестирования культуральных жидкостей использовали несколько модификаций иммunoферментного анализа (ИФА). Культуры, продуцирующие антитела, клонировали методом лимитирующих разведений и затем прививали внутрибрюшинно мышам F1(SJL/J×BALB/c), получившим за 1 нед до этого инъекцию пристана (0.5 мл). На 9—14-е сут собирали асцитическую жидкость, глобулиновую фракцию которой осаждали сульфатом аммония при 50%-ном насыщении и тестировали одним из описанных ниже методов. Очистку МКАТ проводили на колонке с протеином G.

**Электрофорез и иммуноблотинг.** Электрофоретическое разделение белков проводили в 8%-ном полиакриламидном геле. Перед внесением в гель пробы белков нагревали 7 мин при 90 °C в буферном растворе, содержащем (восстанавливающие условия) или не содержащем (невосстанавливающие условия) β-меркаптоэтанол. Для выявления антигенов методом иммуноблотинга использовали полусухой метод переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану. Блокирующий раствор, в котором инкубировали мембранны и разводили меченные антитела, состоял из ФСР, содержащего 5 мг/мл бычьего альбумина и 0.05 % Tween-20. Мембранны инкубировали 30 мин в блокирующем растворе, затем 18 ч при 4 °C — в растворе меченых пероксидазой МКАТ. Ферментативную активность выявляли с помощью раствора тетраметиленбензидина (TMB).

**Иммunoферментный анализ.** Антитела к эндоглину в сыворотках мышей и культуральных жидкостях гибридом выявляли с помощью нескольких вариантов ИФА. Для разведения тестируемых проб и отмывания несвязавшихся компонентов использовали трис-буферный солевой раствор, содержащий 0.05 % Tween-20. Меченные пероксидазой выявляющие реагенты были приготовлены в лаборатории методом периодического окисления (Nakane, Kawaoi, 1974). Активность ферmenta выявляли с помощью TMB. Для выявления антител в непрямом ИФА рекомбинантные антигены адсорбировали в 96-луночных планшетах в течение 18 ч при 4 °C. Растворы тестируемых жидкостей инкубировали 1 ч при 37 °C. Иммунные комплексы выявляли с помощью козь-

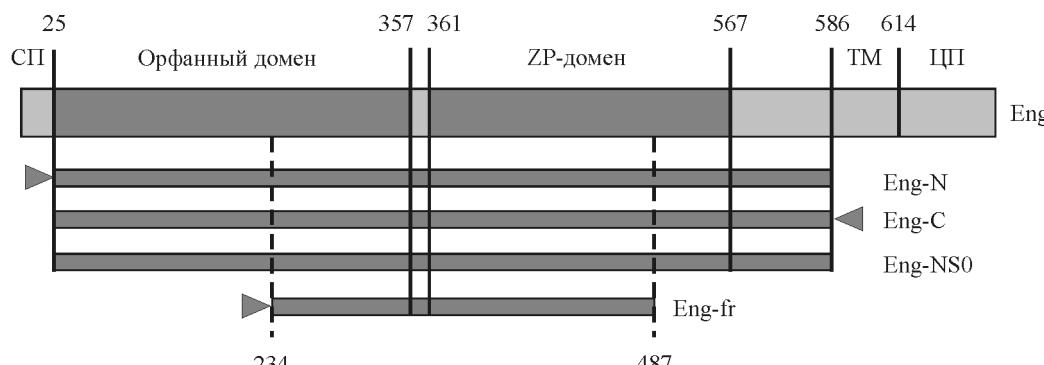


Рис. 1. Схема структуры молекулы эндоглина и его рекомбинантных пептидов.

СП — сигнальный пептид, ZP — зона пеллюцида, TM — трансмембранный участок, ЦП — цитоплазматический участок. Цифрами обозначены положения АКО на границах доменов в нативной молекуле и границы рекомбинантных пептидов, треугольниками показано положение гексагистидиновых групп в рекомбинантных полипептидах.

их антител к иммуноглобулинам мыши, меченых пероксидазой (инкубация 45 мин при 37 °C).

Для определения конформационной или линейной природы распознаваемых МКАТ эпитопов раствор Eng-NS0 (1 мкг/мл) подвергали термической денатурации (90 °C, 7 мин) или восстановлению дисульфидных связей с помощью 0,75 % β-меркартоэтанола в тех же температурных условиях. Затем обработанные антигены адсорбировали на поверхности планшетов и выявляли связавшиеся с ними МКАТ.

Для оценки способности антител распознавать антиген в растворе использовали биотинилированные рекомбинантные фрагменты эндоглина, приготовленные в лаборатории. На пластик адсорбировали немеченные козьи антитела против иммуноглобулинов мышей, затем последовательно инкубировали с растворами антител и меченным биотином Eng-N. Связывание биотинилированных молекул выявляли с помощью стрептавидин-пероксидазы.

При разработке двухцентрового варианта ИФА раствор одного из тестируемых МКАТ адсорбировали в лунках планшетов 18 ч при 4 °C, затем добавляли антиген (Eng-NS0) и через 1 ч инкубации при 37 °C выявляли иммунный комплекс с помощью второго МКАТ к эндоглину, меченного пероксидазой.

Для оценки связывания антител с мембранный формой эндоглина клетки разных линий рассевали в 96-луночные планшеты и культивировали до достижения 90—100 % конфлюэнта. Монослои клеток отмывали ФСР, фиксировали 10 мин 0,25%-ным раствором глутаральдегида, после чего блокировали раствором, содержащим 0,15 % казеина. Затем клеточный монослои последовательно инкубировали с тестируемыми антителами (1 ч, 37 °C) и с меченными пероксидазой козьими антителами к иммуноглобулинам мыши (45 мин, 37 °C).

Для выявления топографически сближенных эпитопов проводили конкурентный ИФА на культурах клеток линии HEP G2. Растворы тестируемых МКАТ в концентрациях от 0,01 до 10 мкг/мл смешивали с меченными пероксидазой одноименными или разноименными МКАТ и инкубировали в планшетах, содержащих монослои клеток HEP G2 (2 ч при 37 °C). После внесения ТМВ измеряли оптическую плотность (ОП).

**Иммунофлуоресценция.** Метод непрямой иммунофлуоресценции использовали для визуализации антигена на клеточной мембране. Культивируемые клетки

засевали на покровные стекла, покрытые желатином, и выращивали до 60—70 % конфлюэнта монослоя. Раствор МКАТ (5 мкг/мл) готовили на блокирующем буфере, содержащем ФСР, 10 % ЭТС и 1 мг/мл азива натрия. Стекла с клетками инкубировали 1 ч в растворе МКАТ, затем 30 мин в козьих антителах к иммуноглобулинам мыши, меченых флуоресцеином, разведенных на блокирующем растворе. Препараты заключали в смесь Mowiol: PPD (9 : 1) и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Scope. A1 (Zeiss, Германия) и цифровой камеры AxioCam MRm.

**Статистическая обработка и визуализация данных** выполнена с применением языка R (версия 3.1.3) и графических пакетов ggplot2 и grid (пакеты доступны на сайте CRAN).

**Использованные реактивы.** Рекомбинантный экстраклеточный домен эндоглина, синтезированный в клетках NS0 (R&D Systems, кат. № 1097-CF), МКАТ к CD105, меченные фикоэритрином (Becton-Dickinson, США); полный и неполный адьюванты Фрейнда, N-гидроксисукцинимидный эфир биотина, ТМВ для Вестерн-блоттинга, пристан, Mowiol (Sigma-Aldrich, США); пероксидаза хрена (Kem-en-Tec, США); штаммы *E. coli* M15 [pREP4] (QIAGEN, Нидерланды) и рET-21b(+) (NEB, Великобритания); культуральные среды α-MEM и DMEM-F12, эмбриональная телячья сыворотка, раствор трипсин-версена (Биолот, Россия); ТМВ для ИФА (Хема-медикус, Россия); коньюгат стрептавидина и пероксидазы хрена (Алкор-Био, Россия); 96-луночные планшеты для ИФА (Nunc Maxisorp, Дания) и культивирования клеток (Nunc, Дания); Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia, Швеция).

## Результаты

**Рекомбинантные фрагменты эндоглина**, полученные в лаборатории. Для скрининга надсадков гибридом и исследования иммунохимических свойств МКАТ получены три рекомбинантных белка (рис. 1). Eng-N и Eng-C представляют собой экстраклеточные участки эндоглина с гексагистидиновыми мотивами на N- и C-концах соответственно. Eng-fr включает в себя его центральный участок. Секвенирование плазмид не выявило мутаций, приводящих к аминокислотным заменам в последовательности этих белков. При экспрес-

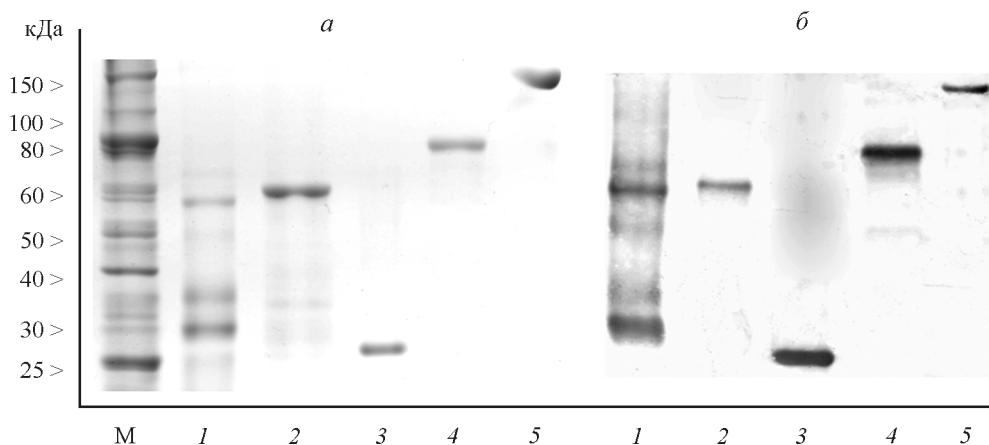


Рис. 2. Электрофоретическое разделение в 8%-ном геле (а) и выявление методом иммунооблотинга (б) рекомбинантных антигенов с помощью МКАТ 2Е1.

Пробы перед внесением в гель были подвергнуты термической денатурации в восстанавливающих (1—4) и в невосстанавливающих (5) условиях. M — маркер молекулярной массы, 1 — Eng-N, 2 — Eng-C, 3 — Eng-fr, 4 и 5 — Eng-NS0.

ции в *E. coli* все три пептида образуют труднорастворимые тельца включения. Ввиду этого для их очистки был использован буфер с 8 М мочевиной, а тельца включения дополнительно дезинтегрировали с помощью ультразвуковой обработки. Электрофорограмма аффинно очищенных рекомбинантных белков представлена на рис. 2, а. Eng-N синтезируется в виде пептидов различной длины, которые удерживаются на колонке за счет расположенного на N-конце гексагистидинового мотива. С-концевое положение этого участка в Eng-C позволяет очищать только полностью синтезированные молекулы.

Экспрессия CD105 на культивируемых клетках. Данные цитофлуорометрического анализа МСК жировой ткани, клеток ECV304 и HEP G2 (рис. 3) позволили установить, что в наибольшей мере антиген CD105 экспрессирован на мемbrane МСК, в наименьшей — на клетках линии ECV304. Клетки линии HEP G2 имели высокую плотность эндоглина на поверхности, а их популяция была наиболее гомогенной по этому показателю. Поскольку клетки гепатокарциномы обладают

значительно большей пролиферативной активностью, чем МСК, они были выбраны в качестве субстрата для проведения клеточного ИФА при тестировании сывороток мышей и скрининге гибридом.

**Иммунизация мышей.** Сыворотки мышей, иммунизированных Eng-NS0 или Eng-fr, были исследованы методом ИФА с иммобилизованными на твердой фазе рекомбинантными молекулами эндоглина Eng-C (рис. 4). Связывание антител с антигеном бактериального происхождения было высоким во всех сыворотках независимо от использованного иммуногенса.

Иную картину наблюдали при титровании тех же сывороток на фиксированных клетках линии HEP G2. Высокие показатели ОП и высокие титры антител наблюдали только в сыворотках мышей, иммунизированных Eng-NS0. На основании приведенных данных для опытов по гибридизации были выбраны животные, иммунизированные гликозилированным рекомбинантным полипептидом Eng-NS0.

**Скрининг гибридом и получение МКАТ.** От мышей-доноров, выбранных для опытов по гибридизации, были получены селезенки и приготовлены индивидуальные клеточные суспензии. Суспензию клеток одной из селезенок разделили на две равные части и использовали в двух последовательных опытах по гибридизации.

В первом опыте скрининг культур начинали с выявления антител, которые распознавали биотинилированный Eng-N в растворе или Eng-C, адсорбированный на твердую фазу. В результате клонирований, повторных тестирований и пассирования в виде асцитических опухолей были получены четыре штамма гибридом (наименования штаммов приведены в табл. 1). Тестирование методом клеточного ИФА выявило среди них два реагента, которые распознавали антиген на клетках HEP G2.

Во втором опыте по гибридизации первый скрининг культур проводили методом ИФА на клетках HEP G2 и после этого выполняли тестирование на бактериальных рекомбинантных фрагментах. В результате было получено шесть штаммов-продуцентов МКАТ (наименования штаммов приведены в табл. 1).

**Иммunoхимическая характеристика МКАТ.** Первым этапом изучения полученных МКАТ было исследование их связывания с рекомбинантными

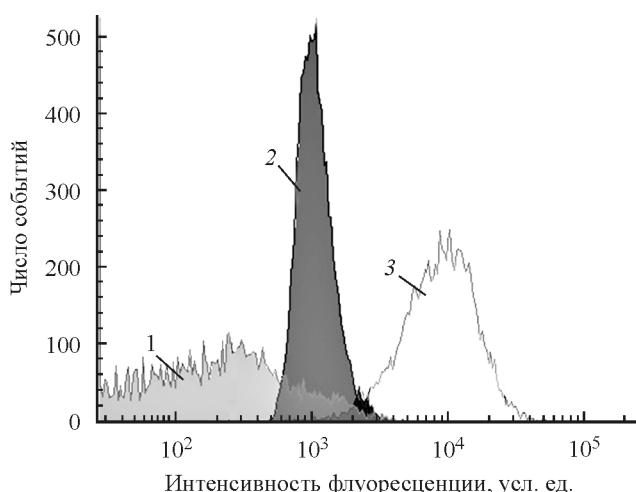


Рис. 3. Распределение интенсивности флуоресценции клеток эндотелия линии ECV304 (1), гепатокарциномы HEP G2 (2) и МСК жировой ткани (3), меченных с помощью антител к CD105, конъюгированных с фикоэритрином.

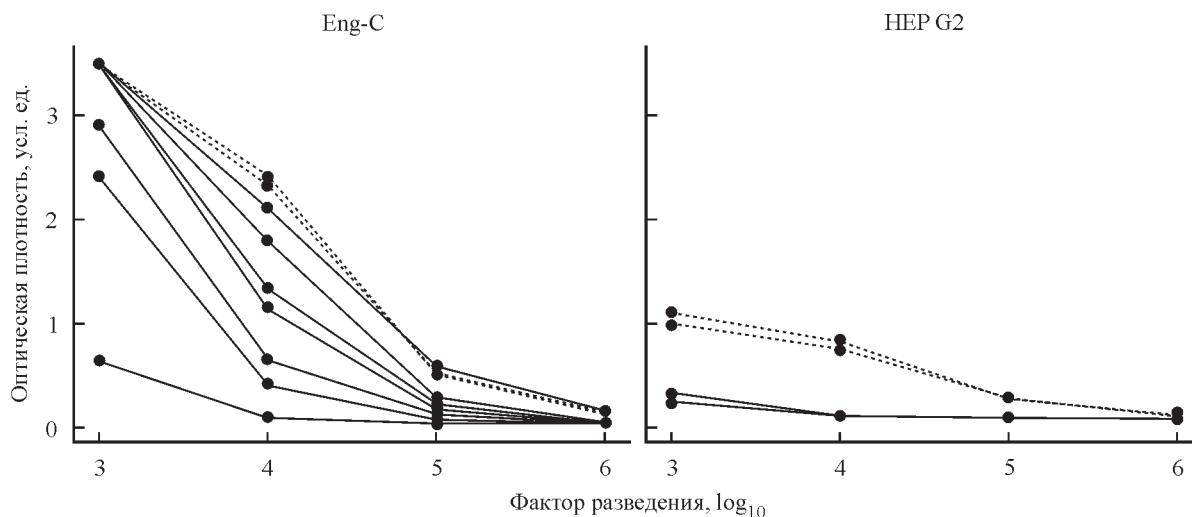


Рис. 4. Графики титрования сывороток мышей, иммунизированных Eng-fr (сплошные линии) или Eng-NS0 (пунктирные линии), на рекомбинантном полипептиде Eng-C и на фиксированных клетках HEP G2.

фрагментами эндоглина. Все МКАТ связывались с полноразмерным бактериальным фрагментом Eng-C (табл. 1). С коротким центральным фрагментом Eng-fr взаимодействовало одно антитело (2E1). Все МКАТ распознавали эпитопы на нативной рекомбинантной молекуле гликозилированного антигена Eng-NS0. Для выяснения природы распознаваемых эпитопов было проведено сравнение связывания МКАТ с нативным Eng-NS0, с тем же белком, денатурированным нагреванием, а также с белком, подвергнутым тепловой денатурации в сочетании с восстановлением дисульфидных связей с помощью  $\beta$ -меркаптоэтанола (рис. 5). Эпитопы, которые сохранялись на денатурированных молекулах после восстановления дисульфидных связей, определялись первичной аминокислотной последовательностью и были обозначены как линейные. Было обнаружено два МКАТ (2E1 и 4B7), распознавающих линейные эпитопы антигена. Оба этих реагента были получены в результате первой гибридизации. Они

позволяли выявлять как димерные, так и мономерные молекулы эндоглина методом иммунооблотинга (рис. 2, б).

Эпитопы, которые частично сохранялись после денатурации и восстановления дисульфидных связей, относились к категории конформационно-зависимых (С-зависимых). Одно МКАТ (4C9) взаимодействовало с эпитопом такого рода. Наконец, два МКАТ связывали эпитопы, которые сохранялись после тепловой денатурации, но разрушались после восстановления дисульфидных связей. Они были обозначены как S-S-зависимые. Остальные антитела распознавали конформационные эпитопы, которые не сохранялись на денатурированных молекулах.

Взаимное расположение эпитопов, распознаваемых МКАТ, определяли с помощью конкурентного ИФА на клетках HEP G2. Значения ОП в ячейках, содержащих одноименные меченные и немеченные МКАТ в концентрации 10 мкг/мл, принимали за 100 % (полное ингибирование связывания). Величины ОП в

Таблица 1

**Взаимодействие МКАТ с рекомбинантными антигенами, антигеном на клетках линии HEP G2 и свойства распознаваемых МКАТ эпитопов**

Номер опыта	МКАТ	Рекомбинантные антигены				Клетки HEP G2	Свойства эпитопов		
		на твердой фазе		в растворе					
		Eng-C	Eng-fr	Eng-NS0	Eng-N				
1	2E1	+	+	+	+	+	Линейный »		
	4B7	+		+	+		С-зависимый		
	4C9	+		+	+		Конформационный		
	4FH	+		+	+		»		
	1B4	+		+	+	+	S-S-зависимый		
2	5B6	+		+		+	То же		
	5H7	+		+		+	Конформационный		
	2C8	+		+		+	»		
	3G2	+		+	+	+	Не установлено		
	5G7	+		+		+			

Примечание. Знаком «+» обозначено наличие взаимодействия МКАТ с антигенами, пустые ячейки обозначают отсутствие взаимодействия.

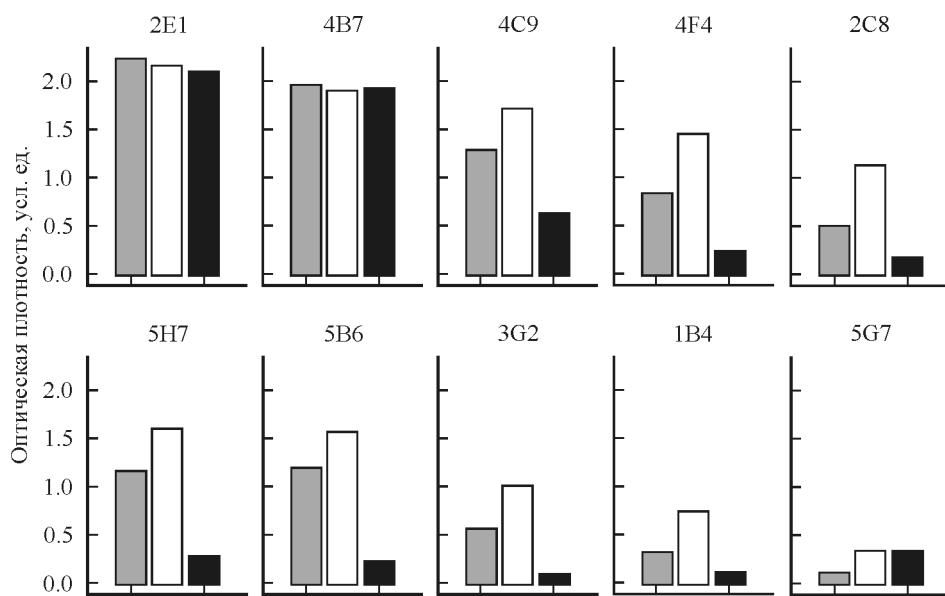


Рис. 5. Связывание MKAT с нативным антигеном Eng-NS0 (белые столбцы), Eng-NS0, денатурированным нагреванием до +90 °С (серые столбцы), или Eng-NS0, денатурированным нагреванием в присутствии β-меркаптоэтанола (черные столбцы).

Обозначения над каждой гистограммой — индексы исследуемых MKAT.

ячейках, не содержащих конкурирующих немеченых MKAT, принимали за 0 %. Ингибиование связывания выше 70 % указывало на распознавание двумя MKAT идентичного или двух топографически сближенных эпипотопов. Ингибиование в пределах 30—70 % свидетельствовало о том, что связывание немеченого MKAT частично препятствовало взаимодействию меченого реагента со своим эпипотопом. Наконец, уровень ингибиования ниже 30 % наблюдали в том случае, когда два MKAT распознавали пространственно удаленные эпипотопы и связывание одного из них не препятствовало взаимодействию другого MKAT с антигеном.

Данные конкурентного ингибиования (табл. 2) указывали на то, что MKAT распознавали два антигенных кластера на мембранный форме эндоглина. Эпипотопы в одном из кластеров связывали MKAT 5B6 и 5H7, а в дру-

гом — MKAT 4F4 и 1B4. Два реагента (5G7 и 4C9) были направлены к двум разным эпипотопам, топографически сближенным с указанными кластерами. Наконец, MKAT 2C8 и 3G2 распознавали на молекуле антигена два эпипотопа, удаленных от остальных эпипотопов.

Выявление эндоглина в растворе. Разработка двухцентровой системы ИФА требовала подбора комплементарных пар антител, одно из которых служило для захвата антигена из раствора, а другое, меченное ферментом, распознавало его в составе иммунного комплекса с первым антителом. Были испытаны различные сочетания MKAT. В результате была выбрана комплементарная пара, состоявшая из адсорбированного на твердой фазе MKAT 4F4 и выявляющего MKAT 4C9, конъюгированного с ферментом. В качестве выявляемого антигена использовали Eng-NS0 в концентрации от 0.1 до 20 нг/мл (рис. 6, а). Использование этой системы позволило проследить динамику накопления сбрасываемого с мембранных внеклеточного фрагмента эндоглина в культуральной среде клеток EA. hy926 (рис. 6, б).

Выявление экспрессии CD105 на клетках. Способность MKAT распознавать мембранный форму эндоглина исследовали на клетках линии HEP G2. Всего было выявлено восемь MKAT, которые связывались с антигеном на клетках (рис. 7). Среди реагентов, полученных в результате первого опыта по гибридизации, таких антител было два — 4C9 и 4F4. Все MKAT, полученные во втором опыте, взаимодействовали с антигеном на клеточной мембране.

Распознавание CD105 полученными антителами исследовали на МСК жировой ткани, клетках двух эндотелиальных линий (ECV304 и EA. hy926), двух морфологически различных линиях глиобластом человека (A172 и T98G), а также на линии клеток эмбриональной почки человека (HEK293). При подготовке клеток для каждого опыта в центральные четыре ряда 96-луночного планшета засевали клетки HEP G2, которые служили референс-культурой. В первых и последних четырех рядах планшета выращивали клетки тестируемых линий. По-

Таблица 2

Конкурентное ингибиование немечеными MKAT связывания меченных пероксидазой MKAT с CD105 на клетках HEP G2

Немеченные MKAT	Меченные пероксидазой MKAT		
	4C9	4F4	5B6
4C9	++		+
4F4	+	++	+
1B4	+	++	
5B6		+	++
5H7			++
5G7		+	+
2C8			
3G2			

Примечание. «++» — ингибиование связывания более 70 %, «+» — ингибиование от 30 до 70 %, пустые ячейки — ингибиование менее 30 %.

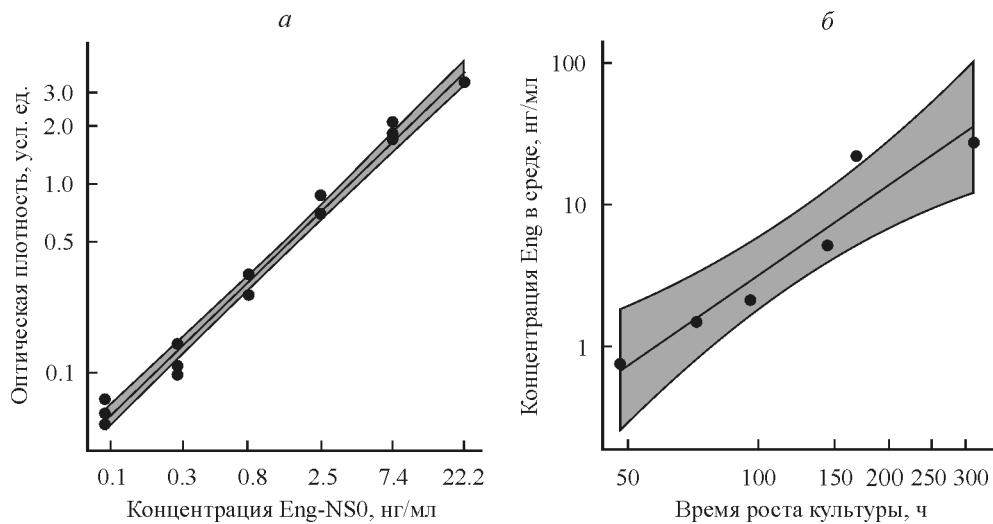


Рис. 6. Количественное определение эндоглина в растворе с помощью системы двухцентрового ИФА.

*а* — калибровочный график выявления эндоглина Eng-NS0 с помощью МКАТ 4F4 на твердой фазе и меченного пероксидазой МКАТ 4C9; *б* — динамика накопления эндоглина в среде культивирования клеток эндотелия линии EA.hy926. Прямые линии — линии регрессии, серые зоны — их 95%-ные доверительные интервалы.

севые дозы клеток подбирали заранее, чтобы одновременно получить конфлюэнтные монослой всех трех культур в каждом планшете. Такая постановка опытов позволила стандартизировать показатели ОП исследуемых культур клеток относительно данных референсных клеток НЕР G2 (рис. 8).

На рис. 8 можно видеть, что наибольший уровень экспрессии CD105 присущ МСК и клеткам EA. hy926. Клетки линий ECV304 и А172 экспрессируют антиген примерно на том же уровне, что и клетки НЕР G2. Две клеточные линии — Т98G и НЕК293 — имеют низкий уровень экспрессии этого маркера.

Для визуализации связывания МКАТ с антигеном на клеточной мемbrane использовали метод непрямой иммунофлуоресценции. На рис. 9 приведен пример выявления CD105 на клетках EA. hy926, НЕР G2 и НЕК293 с помощью МКАТ 4C9.

## Обсуждение

Гибридомы-продуценты МКАТ, которые позволили впервые идентифицировать эндоглин, были созданы на основе лимфоцитов мышей, иммунизированных клетками лейкемии человека или белками, выделенными из лизатов таких клеток (Quackenbush, Letarte, 1985; Haruta, Seon, 1986). Предпринятая в настоящей работе попытка заменить нативный антиген фрагментами, синтезированными в *E. coli*, не привела к желаемому результату. Рекомбинантные полипептиды в силу отсутствия в их составе углеводных компонентов обладали низкой гидрофильностью. Наличие в составе молекул ZP-домена также способствовало их агрегации. При введении мышам эти полипептиды вызывали продукцию антител, но их способность распознавать мембранный форму эндоглина была низкой. Тем не менее полипептиды бактери-

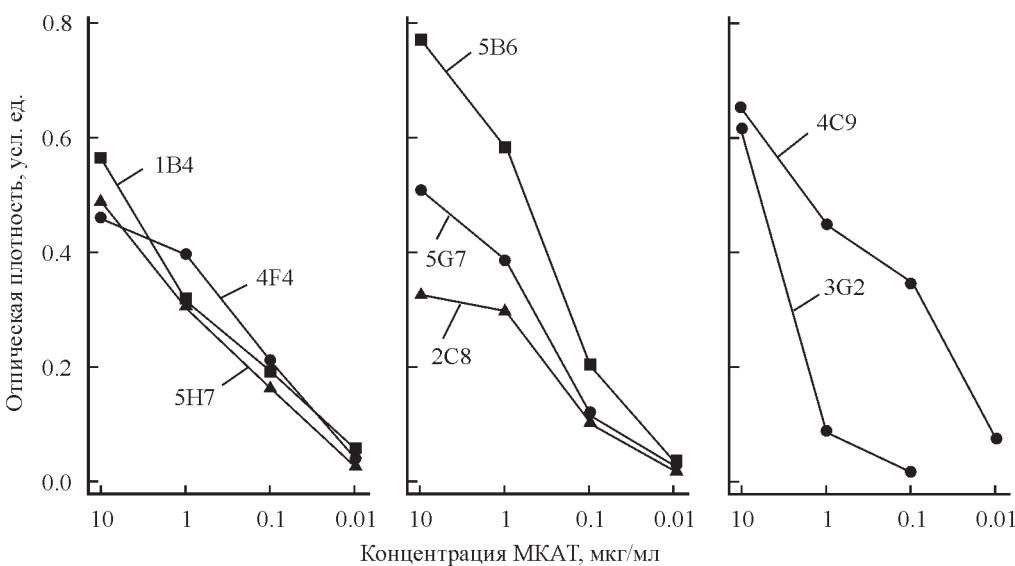


Рис. 7. Графики титрования МКАТ на клетках НЕР G2 при использовании метода ИФА.

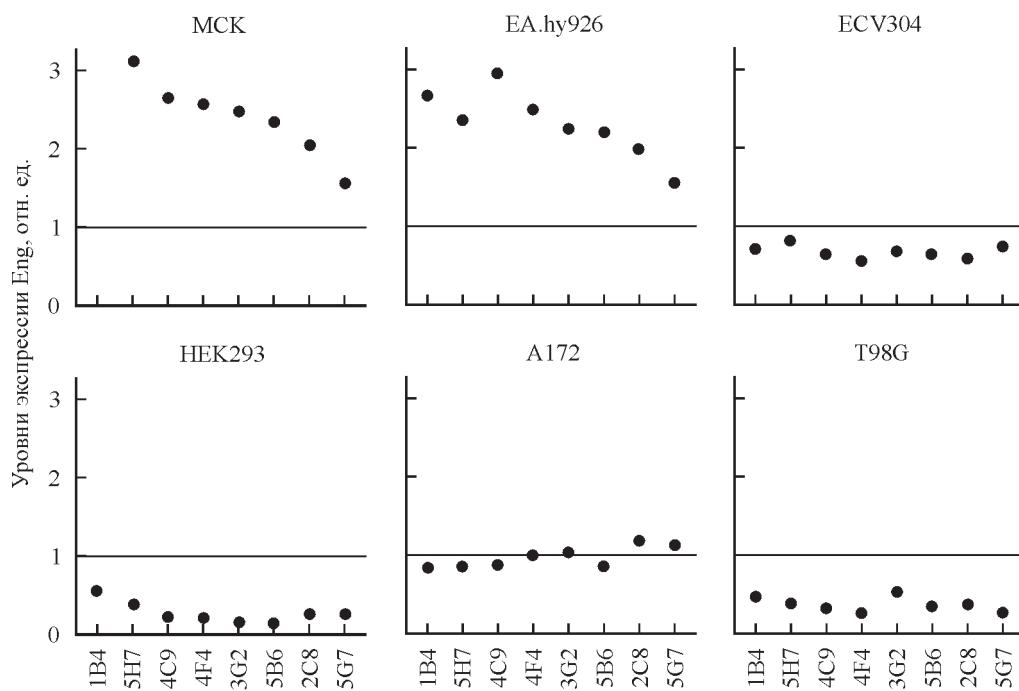


Рис. 8. Сравнение уровней экспрессии эндоглина, выявленных с помощью МКАТ, на мембранах клеток различных линий. Наименования клеточных линий указаны над соответствующими частями рисунка. Значения ОП, полученные для клеток НЕР G2, приняты за 1 (горизонтальные линии). Внизу по горизонтали — шифры исследуемых МКАТ.

ального происхождения оказались полезными при характеристике многих МКАТ к эндоглину как в настоящей работе, так и в других исследованиях (Pichuanthes et al., 1997; Van et al., 2009).

Решению поставленных в работе задач способствовали использование гликозилированного иммуногена Eng-NS0 и обнаружение способности клеток линии НЕР G2 экспрессировать на мемbrane легко детектируемые количества молекул антигена CD105. Иммунизация гликозилированным антигеном позволила индуцировать у мышей синтез антител, которые взаимодействовали с нативными молекулами, синтезируемыми нормальными и трансформированными клетками человека (МСК, НЕР G2 и EA. hy926).

Сочетание при скрининге гибридом двух подходов — выявления антител с помощью рекомбинантных по-

липептидов и детекции антител с помощью ИФА на клетках, экспрессирующих мембранный форму антигена, позволило отобрать клонны-продуценты МКАТ, распознавающих различные эпитопы на нативных и денатурированных молекулах эндоглина. Использование ИФА на клетках для первичного скрининга гибридов позволило изолировать культуры, продуцирующие антитела, специфичные к эпитопам CD105.

Согласно опубликованным данным, участки молекулы эндоглина, ответственные за передачу ангиогенных сигналов, при иммунизации мышей линии BALB/c вызывают слабый иммунный ответ (Nolan-Stevaux et al., 2012). В настоящей работе в качестве доноров иммунных спленоцитов были использованы мыши F1(SJL/J×BALB/c). Этот выбор был продиктован ранее полученными в лаборатории данными о том, что репертуар эпитопной специ-

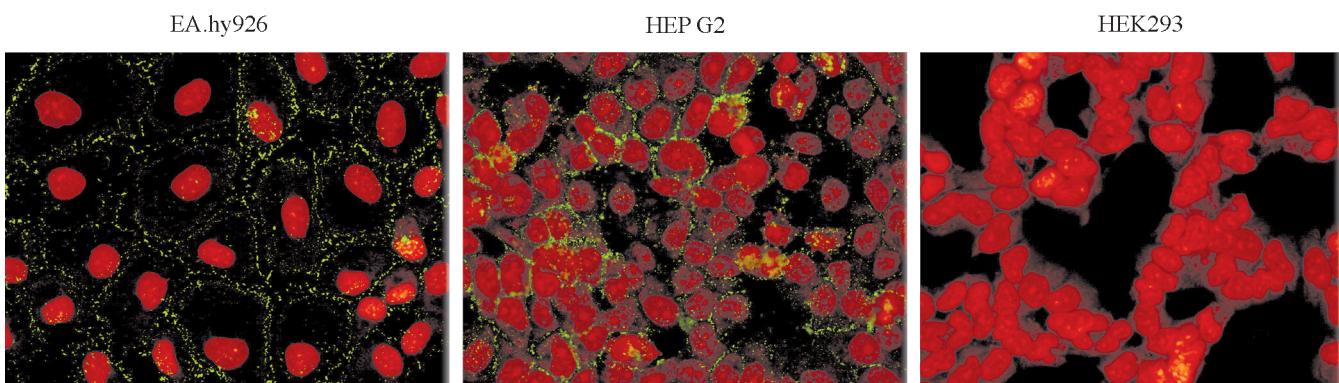


Рис. 9. Выявление CD105 (зеленое свечение) на мембранах клеток эндотелия (EA.hy926), гепатокарциномы (HEP G2) и клеток эмбриональной почки человека (HEK293).

Клетки выращены на покровных стеклах, покрытых желатином, проинкубированы в растворе МКАТ 4C9 (5 мкг/мл), затем в меченных флуоресцеином козьих антителах против иммуноглобулинов мыши. Ядра окрашены иодидом пропидия (красное свечение). Об. 10×.

фичности антител, генерируемых животными генотипов SJL/J и F1(SJL/J×BALB/c), отличается своеобразием (Климович и др., 1999).

Полученное семейство содержит десять новых МКАТ, распознающих на молекуле эндоглина не менее восьми антигенных участков. Все десять МКАТ распознают детерминанты, представленные на нативной молекуле эндоглина; два из них распознают также денатурированный антиген. Восемь из полученных МКАТ взаимодействуют с мембранный формой эндоглина CD105. Молекула эндоглина является гомодимером, обладает сложной трехмерной структурой и вовлечена в образование мультимерных рецепторных комплексов, в состав которых входят другие мембранные-ассоциированные молекулы. Поэтому установление точного количества распознаваемых МКАТ эпигенетов и выяснение их взаимного расположения требуют дальнейших исследований.

Растворимая форма эндоглина появляется в среде культивирования клеток вследствие активности матриксной металлопротеазы MMP—14, которая отщепляет практически всю экстраклеточную часть молекулы (Hawinkels et al., 2010). Ее молекулярная масса должна быть близка к 80 кДа (Van et al., 2009). В то же время масса растворимой молекулы эндоглина, выявляемой в сыворотке крови человека, близка к 65 кДа (Gregory et al., 2013). Причину этого расхождения еще предстоит установить. Созданная в настоящей работе на основе полученных МКАТ двухцентровая иммуноферментная система позволяет детектировать до 0,1 нг/мл эндоглина в среде культивирования клеток. Возможно, с помощью новых МКАТ удастся уточнить представления о происхождении и структуре растворимой формы молекулы эндоглина.

### Список литературы

- Климович В. Б., Самойлович М. П., Грязева И. В., Крутешкая И. Ю., Пашкова С. Ф., Руденко И. Я. 1999. Моноклональные антитела на основе репертуара иммунного ответа мышьей линии SJL/J. Мед. иммунол. 1 (1—2) : 47—58. (Klimovich V. B., Samoilovich M. P., Griazeva I. V., Krutetskaya I. Yu., Pashkova S. F., Rudenko I. Ya. 1999. Monoclonal antibodies based on repertoire of mice line SJL/J. Med. Immunol. 1 : 47—58.)
- Пиневич А. А., Самойлович М. П., Шашкова О. А., Варташян Н. Л., Полясов В. Н., Киселева Л. Н., Карташев А. В., Айзенштадт А. А., Климович В. Б. 2014. Характеристика мезенхимальных стромальных клеток при раке молочной железы. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2 : 84—91. (Pinevich A. A., Samoilovich M. P., Shashkova O. A., Vartanyan N. L., Polysalov V. N., Kiseleva L. N., Kartashov A. V., Aizenstadt A. A., Klimovich V. B. 2014. Characteristics of mesenchymal stromal cells isolated from patients with breast cancer. Cell Technol. in Biol. Med. 2 : 666—672.)
- Banerjee S., Dhara S. K., Bacanamwo M. 2012. Endoglin is a novel endothelial cell specification gene. Stem Cell Res. 8 : 85—96.
- Barbara N. P., Wrana J. L., Letarte M. 1999. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. J. Biol. Chem. 274 : 584—594.
- Brewer C. A., Setterdahl J. J., Li M. J., Johnston J. M., Mann J. L., McAsey M. E. 2000. Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer. Obstet. Gynecol. 96 : 224—228.
- Caplan A. I. 2008. All MSCs are pericytes? Cell Stem Cell. 3 : 229—230.
- Castonguay R., Werner E. D., Matthews R. G., Presman E., Mulivor A. W., Solban N., Sako D., Pearsall R. S., Underwood K. W., Seehra J., Kumar R., Grinberg A. V. 2011. Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. J. Biol. Chem. 286 : 30 034—30 046.
- Edgell C. J., McDonald C. C., Graham J. B. 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. PNAS. 80 : 3734—3737.
- Galfrè G., Milstein C. 1982. Chemical typing of human kappa light chain subgroups expressed by human hybrid myelomas. Immunology. 45 : 125—128.
- Gregory A. L., Xu G., Sotov V., Letarte M. 2013. Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta. Placenta. 35 : S93—S99.
- Haruta Y., Seon B. K. 1986. Distinct human leukemia-associated cell surface glycoprotein GP160 defined by monoclonal antibody SN6. PNAS. 83 : 7898—7902.
- Hawinkels L. J., Kuiper P., Wiercinska E., Verspaget H. W., Liu Z., Pardali E., Sier C. F., ten Dijke P. 2010. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. Cancer Res. 70 (10) : 4141—4150.
- Lee S. Y., Hong Y. D., Felipe P. M., Pyun M. S., Choi S. J. 2009. Radiolabeling of monoclonal anti-CD105 with <sup>177</sup>Lu for potential use in radioimmunotherapy. Appl. Radiat. Isot. 67 : 1366—1369.
- Nakane P. K., Kawaoi A. 1974. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem. 22 : 1084—1091.
- Nassiri F., Cusimano M. D., Scheithauer B. W., Rotondo F., Fazio A., Yousef G. M., Syro L. V., Kovacs K., Lloyd R. V. 2011. Endoglin (CD105) : a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. Anticancer Res. 31 : 2283—2290.
- Nolan-Stevaux O., Zhong W., Culp S., Shaffer K., Hoover J., Wickramasinghe D., Rueffl-Brasse A. 2012. Endoglin requirement for BMP9 signaling in endothelial cells reveals new mechanism of action for selective anti-endoglin antibodies. PLoS ONE. 7 : 1—12.
- Pichuanes S., Vera S., Bourdeau A., Pece N., Kumar S., Wayner E. A., Letarte M. 1997. Mapping epitopes to distinct regions of the extracellular domain of endoglin using bacterially expressed recombinant fragments. Tissue Antigens. 50 : 265—276.
- Quackenbush E. J., Letarte M. 1985. Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies. J. Immunol. 134 : 1276—1285.
- Seon B. K., Haba A., Matsuno F., Takahashi N., Tsujie M., She X., Harada N., Uneda S., Tsujie T., Toi H., Tsai H., Haruta Y. 2011. Endoglin-targeted cancer therapy. Curr. Drug. Deliv. 8 : 135—143.
- Shi S., Yang K., Hong H., Valdovinos H. F., Nayak T. R., Zhang Y., Theuer C. P., Barnhart T. E., Liu Z., Cai W. 2013. Tumor vasculature targeting and imaging in living mice with reduced graphene oxide. Biomaterials. 34 : 3002—3009.
- Tsujie M., Tsujie T., Toi H., Uneda S., Shiozaki K., Tsai H., Seon B. K. 2008. Anti-tumor activity of an anti-endoglin monoclonal antibody is enhanced in immunocompetent mice. Int. J. Cancer. 122 : 2266—2273.
- Uneda S., Toi H., Tsujie T., Tsujie M., Harada N., Tsai H., Seon B. K. 2009. Anti-endoglin monoclonal antibodies are effective for suppressing metastasis and the primary tumors by targeting tumor vasculature. Int. J. Cancer. 125 : 1446—1453.
- Van Le B., Franke D., Svergun D. I., Han T., Hwang H. Y., Kim K. K. 2009. Structural and functional characterization of soluble endoglin receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 383 : 386—391.

## PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF THE PANEL OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN ENDOGLIN

*I. V. Smirnov,<sup>1, 2</sup> I. V. Gryazeva,<sup>1</sup> M. P. Samoilovich,<sup>1, 3</sup> L. A. Terekhina,<sup>1</sup> A. A. Pinevich,<sup>1, 3</sup>  
A. A. Krylova,<sup>1</sup> I. Yu. Krutetskaia,<sup>1</sup> N. N. Nikolsky,<sup>2</sup> V. B. Klimovich<sup>1, \*</sup>*

<sup>1</sup> Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg 197758;

<sup>2</sup> Institute of Cytology, St. Petersburg 194064,

and <sup>3</sup> S.-Petersburg State University, St. Petersburg 199034;

\* e-mail: vklimovich@gmail.com

Endoglin (CD105) is the marker of endothelial and mesenchymal stem cells and the component of TGF- $\beta$ , BMP-9 and BMP-10-binding receptor complexes. Its expression is significantly increased on blood vessels endothelium of ischemic tissues and growing tumors. Measurement of concentration of the soluble endoglin in the serum or urine is used as a method for diagnosing cancer and pregnancy disorders. The aim of this work was to create a novel family of monoclonal antibodies recognizing endoglin on the cell surface and in biological fluids. Murine myeloma cells' derived recombinant protein representing the whole extracellular part of endoglin was used as an antigen. F1(SJL/J×BALB/c) mice were the donors of immune splenocytes. Hybridoma screening procedures were performed using *E. coli*-produced copies of the antigen, endoglin-expressing immortalized human cell lines, and primary cultures of human mesenchymal stromal cells. Ten novel monoclonal antibodies recognizing at least eight distinct epitopes were produced. Eight antibodies bind membrane form of endoglin on the surface of normal and transformed human cells derived from different tissue sources. Two antibodies recognize linear antigenic determinants of the molecule and can be used to detect endoglin by western blot. Sandwich ELISA system was designed in order to measure soluble endoglin in cell culture medium.

**Key words:** endoglin, CD105, monoclonal antibodies.